

Maria Gabriela Serra Ramos

**ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DE UM MEDICAMENTO
EM
HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO**



**Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
1999**

Maria Gabriela Serra Ramos

***ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DE UM MEDICAMENTO EM
HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO***



**Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
1999**

Dissertação da candidatura ao grau de Mestre em Controlo de Qualidade na área
específica de Medicamentos e Plantas Medicinais apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto

Orientadores:

Professora Doutora Margarida Alice Ferreira

Professora Doutora Maria de Lourdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos

Este trabalho teve o apoio financeiro da Associação Nacional das Farmácias no âmbito de um projecto entre o Laboratório de Estudos Farmacêuticos e o Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Aos meus pais...

Ao Ivo...

Agradecimentos

O Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) da Associação Nacional das Farmácias permitiu que, através de um protocolo de cooperação com o Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, realizasse o Mestrado em Controlo de Qualidade, na área específica de Medicamentos e Plantas Medicinais, por forma a aprofundar conhecimentos fundamentais nesta área, para poderem ser transferidos, desenvolvidos e aplicados em estudos a realizar no LEF. Gostaria, por isso, de agradecer em primeiro lugar ao LEF, na pessoa da Dra. Ascensão Farinha, esta oportunidade, que considero ter sido de grande valor, para aumentar os conhecimentos científicos.

Quero, no entanto, exprimir individualmente o meu agradecimento e gratidão:

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, minha orientadora, um sincero agradecimento pela amizade e pela forma sábia, paciente, generosa e compreensiva com que me orientou na execução teórica e experimental desta dissertação, e pela forma carinhosa como me recebeu no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia.

À Professora Doutora Margarida Alice Ferreira, minha orientadora, quero manifestar o meu agradecimento pelo seu apoio, por ter aceite a orientação desta dissertação, por quem tenho uma grande admiração pela sua grande e tão diversa sabedoria.

Ao Professor Doutor Félix Dias Carvalho pela forma apaixonante com que trabalha diariamente e estimula os seus colaboradores, pelo apoio técnico e científico que sempre me deu, pela ajuda no processo de aprendizagem da técnica de isolamento de hepatócitos, bem como na elaboração desta dissertação e pela amizade, os meus sinceros mais agradecimentos.

Ao Dr. Fernando Manuel Gomes Remião agradeço a disponibilidade e o precioso auxílio que me dispensou ao longo da elaboração deste mestrado. Pela sua amizade, os meus mais sinceros agradecimentos.

À Engenheira Maria Elisa Soares, por quem tenho a mais profunda admiração como pessoa e como profissional, pela forma simpática com que trabalha, pelo estímulo que dá constantemente aos colegas de trabalho, pelo apoio e amizade que sempre me proporcionou, ao longo da execução deste mestrado, os meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Helena Carmo e à Dra. Márcia Carvalho no apoio, estímulo e sincera amizade que sempre me proporcionaram, e pelo empenho com que me ajudaram na

execução da parte experimental desta dissertação e na elaboração de alguns trabalhos de componente teórica, os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Eduarda das Graças Rodrigues Fernandes agradeço o apoio dado na técnica de determinação da LDH e a sua amizade.

À Professora Doutora Maria Fernanda Borges agradeço a sua ajuda na discussão de alguns pontos que foram importantes para a evolução do trabalho experimental bem como pela sua amizade.

Ao Professor Doutor José Alberto Duarte, por me ter dado a possibilidade de realizar as determinação de GSH, GSSG no seu laboratório (Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto).

À Dra. Maria João, do laboratório de Bioquímica da FCDEF da Universidade do Porto, pela ajuda na preparação experimental para a determinação de GSH e GSSG.

Ao Professor Doutor Carlos Maurício Barbosa, são devidos os meus agradecimentos por ter sido o eixo de ligação entre o LEF e o Laboratório de Toxicologia, para colocar em prática o protocolo de cooperação assinado entre estas instituições, pois sem a sua intervenção, eu não teria tido esta valiosa oportunidade. Com admiração pelo rigor científico com que trabalha e que transmite aos seus colaboradores e pela compreensão e apoio que me deu, os meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Susana Pinto pelo apoio moral e pelo incentivo que me deu, e que foi muito importante para concluir esta dissertação, pela sua sincera amizade, os meus mais profundos agradecimentos.

Às funcionárias D. Júlia Caraméz e D. Graziela Fernandes pela disponibilidade que sempre demonstraram.

À minha família, Ivo e amigos em geral, pelo apoio, amizade e paciência.

Gostaria de homenagear especialmente os meus pais, José Luís Ramos e Maria Helena Ramos a quem dedico este trabalho. Sem o estímulo que sempre me deram, o sacrifício, a paciência que tiveram para me proporcionarem as condições para poder realizar o curso de licenciatura em Ciências Farmacêuticas e também deste Mestrado, tudo teria sido impossível. A eles agradeço profundamente.

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam da seguinte comunicação

Ramos G, Carvalho F, Bastos ML, Ferreira M (1999) *In vitro* evaluation of the hepatotoxic effects induced by a bronchodilator medicine using isolated rat hepatocytes. 1º Encontro do ICETA/CEQUP. Porto. (comunicação em painel).

Resumo

Estudo da Hepatotoxicidade de um medicamento com a designação comercial
"Prelus elixir composto"
em hepatócitos isolados de rato.

Neste trabalho apresentam-se os resultados dos estudos realizados *in vitro*, em suspensões de hepatócitos isolados de rato, do medicamento "Prelus elixir composto" e de alguns dos seus constituintes farmacologicamente activos. Um dos objectivos do trabalho consistiu em averiguar a hepatotoxicidade de um medicamento com uma composição química bastante complexa, tendo como princípios activos: isoproterenol, efedrina, teofilina, fenobarbital e iodeto de potássio. O outro objectivo consistiu na avaliação de prováveis interacções entre alguns destes componentes bem como de outros que fazem parte da formulação (etanol e vanilina), comparando os resultados desses compostos estudados em associação com os obtidos isoladamente.

Os parâmetros estudados foram: (i) a viabilidade celular, avaliada pela técnica de exclusão do azul de tripano e pela determinação da percentagem de lactato desidrogenase extracelular; (ii) os níveis de glutathiona reduzida e oxidada; (iii) e a peroxidação lipídica através da quantificação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico, nos hepatócitos.

O medicamento em estudo, quando colocado em incubação com a suspensão dos hepatócitos isolados, não provocou diminuição da viabilidade celular para as concentrações e tempos estudados, mas provocou depleção dos níveis de glutathiona reduzida, sem aumentar, no entanto, a formação de glutathiona oxidada. Não houve, para qualquer concentração, expressão de peroxidação lipídica.

Quando se estudou a acção isolada ou em associação de alguns dos constituintes do Prelus, nomeadamente, isoproterenol, vanilina e etanol, não houve, igualmente, diminuição significativa da viabilidade das suspensões celulares. O isoproterenol, a vanilina e o etanol não provocaram alterações significativas nos níveis de glutathiona reduzida e oxidada quando incubados isoladamente. No entanto, a vanilina em associação com o isoproterenol e com o etanol provocou uma depleção significativa da glutathiona reduzida, tendo ainda ocorrido um efeito sinérgico na sua associação com o etanol.

Abstract

“In vitro” evaluation of the Hepatotoxic effects of a pharmacon “Prelus elixir composto” using isolated rat hepatocytes.

This work presents the results obtained in an *in vitro* study performed on the pharmacon “Prelus elixir composto” and some of its pharmacologically active constituents.

One of the aims of this study was to evaluate the hepatotoxicity of a complex pharmacon, constituted by the active compounds isoproterenol, ephedrine, teophylline, phenobarbital and potassium iodide. The other aim consisted in evaluating the possible interactions among some of the active constituents, as well as some others present in the formula (ethanol and vanillin), by comparing the results obtained in association to those obtained with the isolated compounds.

The parameters evaluated in this study were: (i) the cellular viability, determined by the Trypan Blue Exclusion Test and also by the quantification of the percentage of the extracellular lactate dehydrogenase; (ii) the determination of the glutathione in its reduced and oxidised form; (iii) and the lipid peroxidation on the isolated hepatocytes through the quantification of the tiobarbituric acid reactive substances.

This pharmacon, when incubated with the cellular suspension of the isolated hepatocytes, did not reduce the cellular viability at all the concentrations and times studied. However, it was observed a depletion in the levels of the reduced glutathione but there was no increase in the levels of its oxidised form. Furthermore, lipid peroxidation was not found at all the concentrations studied.

The studied constituents of the pharmacon, namely isoproterenol, vanillin and ethanol, either isolated or in association, did not significantly reduce the viability of the cellular suspensions. Similarly, the levels of the reduced and oxidised glutathione were not altered. However, vanillin, when associated with isoproterenol and ethanol induced significant depletion of the reduced glutathione. A synergic effect could be observed when vanillin and ethanol were associated.

Abreviaturas

ADP - adenosina difosfato
ALT - alaninoaminotransferase
AMP - adenosina monofosfato
AMPC - adenosina monofosfato cíclico
AST - aspartato aminotransferase
ATP - adenosina trifosfato
COMT - catecol-o-metiltransferase
DHA - diidroascorbato
DNA - ácido desoxirribonucleico
ECVAAM - Centro europeu para a validação de métodos alternativos
EGTA - ácido etilenoglicol-bis(β -amioetiléter)N,N,N',N'tetracético
Eta - etanol
et al. - e colaboradores
GSH - glutationa reduzida
GR - redutase da glutationa
GSSG - glutationa oxidada
HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
HPLC - cromatografia líquida de alta pressão
Iso - isoproterenol
LDH - desidrogenase láctica
MAO - monoaminoxidase
MDA - malonildialdeído
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NA - noradrenalina
NaCl - cloreto de sódio
NAD⁺ - nicotinamida adenina nucleótido forma oxidada
NADH - nicotinamida adenina nucleótido forma reduzida
NADP - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
NaOH - hidróxido de sódio
p. ex. - por exemplo
ROS - espécies reactivas de oxigénio
SNC - sistema nervoso central
SOD - superóxido dismutase
TBA - ácido tiobarbitúrico
TBARS - substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico
Van - vanilina

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO	1
1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO	3
1.3. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> REALIZADOS	3
1.4. ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	4

2. O FÍGADO

2.1. ÓRGÃO ALVO DA TOXICIDADE DOS XENOBIÓTICOS	5
2.1.1. Morfologia do Fígado	7
2.1.2. Organização do parênquima hepático	7
2.1.3. Fígado - Principal órgão metabolizador	10
2.2. MECANISMOS DE LESÃO E/OU MORTE CELULAR	14
2.2.1. Tipos de lesões hepáticas	15
2.2.1.1. Peroxidação lipídica	17
2.3. ANTIOXIDANTES	21
2.3.1. Antioxidantes enzimáticos	21
2.3.1.1. Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase	21
2.3.2. Antioxidantes não enzimáticos endógenos	21
2.3.2.1. Vitamina E	21
2.3.2.2. Glutathione	22
2.3.2.3. Vitamina C	24
2.3.2.4. Ácido úrico	25

3. MODELOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE

3.1. FATIAS DE FÍGADO COMO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE	27
3.1.1 Potencialidades das fatias de fígado como modelo <i>in vitro</i>	28
3.2. FÍGADO ISOLADO PERFUNDIDO COMO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE	28
3.2.1. Potencialidades e Limitações das técnicas com fígado isolado perfundido	29
3.2.1.1. Potencialidades	29
3.2.1.2. Limitações	29
3.3. CULTURAS DE HEPATÓCITOS COMO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE	30
3.3.1. Morfologia das células	30
3.3.2. Teste de Exclusão do Azul de Tripiano	31
3.3.3. Libertação de enzimas citoplasmáticas	31

3.4. HEPATÓCITOS ISOLADOS	31
3.4.1. Potencialidades e Limitações deste modelo	33
3.4.1.1. Potencialidades do uso de hepatócitos isolados em estudos toxicológicos	33
3.4.1.2. Potencialidades dos ensaios com hepatócitos isolados em suspensão em relação a outros sistemas	34
3.4.1.3. Limitações dos ensaios com hepatócitos isolados em suspensão em relação a outros sistemas hepáticos	35
3.5. EXTRAPOLAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE ESPÉCIES	35
 4. REVISÃO GERAL	
4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS, FARMACOLÓGICAS, FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS (CONHECIDAS) DE ALGUNS COMPONENTES DO “PRELUS-ELIXIR COMPOSTO”	37
4.1.1. Cloridrato de isoproterenol	37
4.1.2. Teofilina	43
4.1.3. Sulfato de efedrina	47
4.1.4. Iodeto de potássio	51
4.1.5. Fenobarbital	52
4.1.6. Vanilina	55
4.1.7. Etanol	58
 5. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DA CITOTOXICIDADE HEPÁTICA DE XENOBIÓTICOS	
5.1. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO	61
5.1.1. Materiais utilizados	61
5.1.2. Animais	61
5.1.3. Preparação da suspensão de hepatócitos	62
5.1.4. Procedimento cirúrgico	65
5.1.5. Sistema de perfusão	65
5.1.6. Perfusão do fígado e isolamento dos hepatócitos	66
5.1.7. Contagem das células	67
5.1.8. Caracterização das suspensões celulares obtidas	67
5.1.8.1. Determinação da viabilidade celular	67
5.1.8.1.1 Exclusão do azul de tripano	68
5.1.8.1.2. Liberação da LDH para o meio extracelular	69
5.1.8.2 Teor em glutatona reduzida (GSH)	72

5.1.8.3. Teor em glutathiona oxidada (GSSG)	72
5.1.8.4. Determinação da extensão da peroxidação lipídica	73
5.1.9. Resultados	75
5.2. APLICAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO NO ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DO PRELUS	76
5.2.1. Condições de incubação das células	76
5.2.2. Monitorização toxicidade ao longo das incubações	77
5.2.2.1. Libertação de LDH para o meio extracelular	77
5.2.2.2. Determinação da glutathiona reduzida (GSH)	77
5.2.2.3. Determinação da glutathiona oxidada (GSSG)	77
5.2.2.4. Determinação da peroxidação lipídica	77
5.2.3. Tratamento dos resultados	78
5.2.4. Resultados	79
5.2.4.1. Libertação de LDH para o meio extracelular	79
5.2.4.2. GSH	80
5.2.4.3. GSSG	81
5.2.4.4. Extensão da peroxidação lipídica	82
5.3. APLICAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO NO ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DE ALGUNS CONSTITUINTES ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO DO PRELUS (ISOPROTERENOL, ETANOL, VANILINA)	83
5.3.1. Condições de incubação das células	83
5.3.2. Monitorização da toxicidade ao longo das incubações	84
5.3.2.1. Libertação de LDH para o meio extracelular	84
5.3.2.2. Determinação da glutathiona reduzida (GSH)	86
5.3.2.3. Determinação da glutathiona oxidada (GSSG)	86
5.3.2.4. Determinação da peroxidação lipídica	87
5.3.3. Tratamento dos resultados	87
5.3.4. Resultados	88
5.3.4.1. Libertação de LDH para o meio extracelular	88
5.3.4.2. GSH	89
5.3.4.3. GSSG	90
5.3.4.4. Extensão da peroxidação lipídica	91
6. DISCUSSÃO	
6.1. RENDIMENTO E VIABILIDADE DAS SUSPENSÕES CELULARES	92

6.1.1. LDH extracelular em hepatócitos isolados incubados com o medicamento em estudo	96
6.1.2. LDH extracelular em hepatócitos isolados incubados com isoproterenol, vanilina e etanol isoladamente ou em associação	97
6.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	97
6.2.1. Glutathiona reduzida	97
6.2.1.1. GSH em hepatócitos incubados com o medicamento em estudo	98
6.2.1.2. GSH em hepatócitos incubados com isoproterenol, vanilina e etanol isoladamente ou em associação	99
6.2.2. Glutathiona oxidada	100
6.2.3. Peroxidação lipídica	100
7. CONCLUSÕES	102
ANEXO 1	104
8. BIBLIOGRAFIA	110

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO

Durante a fase de investigação, desenvolvimento pré-clínico ou desenvolvimento clínico, os compostos farmacologicamente activos podem ser rejeitados devido a elevados níveis de toxicidade. O controlo de qualidade envolve toda a fase de vida de um medicamento e das suas matérias primas e, mesmo após a introdução de um medicamento no mercado, ao nível do nosso país, existe uma legislação que obriga a que os medicamentos sejam reavaliados periodicamente. O que se pode facilmente perceber devido ao ritmo de descobertas e do desenvolvimento tecnológico característico deste nosso fim de século, não sendo de admirar que, para qualquer medicamento, se poderão levantar questões, que neste caso incidem na reavaliação da sua segurança. No sentido de se obter um perfil farmacotoxicológico o mais completo possível, utilizam-se normalmente várias metodologias de “screening”, recorrendo-se para isso a ensaios *in vivo* com várias espécies de animais, incluindo o Homem em fases avançadas do estudo, e a ensaios *in vitro*, recorrendo-se também neste caso a vários sistemas quer celulares quer subcelulares de origem humana ou de outras espécies. Enquanto os modelos *in vivo* são mais usados para estudar os efeitos dos compostos num contexto toxicocinético e suas influências sistémicas, os modelos *in vitro* constituem sistemas ideais para o estudo de mecanismos específicos num meio envolvente perfeitamente controlado (Gad, 1994; Ulrich, RG *et al.* 1995). Os modelos *in vitro* são normalmente seleccionados de acordo com o órgão supostamente alvo da toxicidade do composto em avaliação, sendo o fígado o modelo mais frequentemente utilizado para estudos de toxicidade. Este facto deve-se a várias razões especialmente relacionadas com a “clearance” e a metabolização dos compostos, que é numa grande extensão da responsabilidade deste órgão.

As primeiras tentativas realizadas para a preparação de hepatócitos isolados, que ocorreram entre 1940 e 1965, tinham essencialmente uma natureza empírica. No entanto, baseavam-se em algumas descobertas anteriores (Ringer, 1890; Lillie, 1906), que referiam o papel dos iões cálcio na adesão celular, e que a sua ausência facilitava a separação celular (Anderson, 1953; Branster and Morton, 1957). Estes métodos iniciais utilizavam como modelos fatias de fígado que eram submetidas a agitação mecânica, ou fígado inteiro submetido à perfusão por uma solução isenta de cálcio, por forma a promover a separação celular. Estudos efectuados no início dos anos 60 demonstraram que estes métodos

mecânicos davam origem a preparações em que os hepatócitos estavam muito danificados e perdiam as suas enzimas citoplasmáticas para o meio (Berry, 1962).

Em 1953, Mandl *et al.* isolaram e caracterizaram collagenase do *Clostridium hystoliticum* e Lasfargues, em 1957, utilizou esta enzima para a separação celular durante a cultura de epitélio normal da glândula mamária. Em 1961, esta enzima ficou disponível no mercado pela empresa Worthington Biochemical Corporation e foi utilizada por Rodbell (1964) para o isolamento de adipócitos intactos a partir de tecido adiposo. Três anos mais tarde, Howard *et al.* (1967) divulgaram o primeiro isolamento de hepatócitos de fígado de rato com sucesso, utilizando uma solução salina (solução de Hank), isenta de cálcio, contendo 0,05% de collagenase e 0,01% de hialuronidase (que mais tarde se demonstrou não ser necessária para o processo de separação celular). No entanto, com este método a quantidade final de células intactas representava apenas cerca de 3 a 5 % do fígado original.

Em 1969, Berry and Friend, alteraram esta técnica com apreciável sucesso. Essa alteração consistiu na perfusão do fígado, optimização do acesso da collagenase aos diferentes lóbulos do fígado, oxigenação adequada, melhorando assim a qualidade da suspensão final, praticamente pura e constituída por hepatócitos. Esta técnica ficou conhecida por “one-step collagenase-perfusion technique”.

Seglen, em 1976, introduziu ainda pequenas alterações a esta última metodologia, com base nos seus estudos sobre os efeitos do cálcio e da collagenase no fígado perfundido de rato. Este investigador defendeu que uma vez que a actividade da collagenase é dependente do cálcio, e já que a sua virtual ausência era um pré-requisito para a separação celular, seria boa prática perfundir inicialmente o fígado com uma solução isenta de cálcio e subsequentemente perfundi-lo com uma solução rica em cálcio, contendo collagenase. Esta alteração veio também provar que a restituição dos valores de cálcio era importante para evitar a diminuição do desempenho metabólico dos hepatócitos, associado à falha dos gradientes normais de Na^+/K^+ .

A técnica utilizada para o isolamento dos hepatócitos de rato na componente experimental desta dissertação baseou-se no método de Moldéus *et al.* (1978), também designada por “two-step procedure”, e que será descrita em pormenor no capítulo 5.1.3.

Na realidade todos os anos continuam a ser publicados cerca de 600 trabalhos que têm como base este tipo de modelo, donde se pode depreender que este tema é perfeitamente actual e, provavelmente está em crescimento, se tivermos presente a base

conceptual dos testes alternativos, proposta por Russel e Burch, em 1959 (referido por Gad, 1995), definida por 3 R's, "replacement, reduction and refinement", a que Gad em 1990, acrescentou um quarto R, "responsibility" e que se mantém com perfeita actualidade (Ramos, 1998).

Este trabalho enquadra-se na área da Toxicologia das Misturas Químicas na perspectiva da contribuição para um conhecimento mais aprofundado sobre os efeitos que um medicamento quimicamente complexo pode ter ao nível da toxicidade hepática, bem como das eventuais interacções entre os compostos no respeitante à expressão da toxicidade.

Com este fim, realizaram-se ensaios *in vitro*, com suspensões de hepatócitos isolados de rato.

O medicamento em estudo, que existe comercializado sob o nome "Prelus", tem na sua composição, entre outros compostos, o isoproterenol, o fenobarbital, e o etanol que apresentam uma toxicidade individual conhecida (vide no Anexo 1 o Resumo das Características do Medicamento - RCM).

1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

O objectivo do trabalho realizado no âmbito desta dissertação foi o de verificar se um medicamento com uma composição tão complexa como este apresenta efeitos hepatotóxicos e, em caso afirmativo, tentar investigar qual ou quais dos seus componentes poderão ser responsáveis por esse efeito, e se existe algum tipo de interacção entre os componentes do medicamento, quando associados, por comparação com os resultados desses mesmos compostos estudados isoladamente.

1.3. ESTUDOS *IN VITRO* REALIZADOS

1. Com o medicamento na sua forma integral:

- 1.1. Estudos de citotoxicidade: incubação de hepatócitos isolados de rato com o medicamento em estudo e determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripano e da % de LDH extracelular.
- 1.2. Determinação das alterações nas funções metabólicas, nomeadamente, de depleção de GSH, formação de GSSG e peroxidação lipídica .

2. Com alguns constituintes do medicamento:

- 2.1 Incubação de hepatócitos isolados de rato com alguns compostos do medicamento em estudo, isoladamente e em associação, e determinação da viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano e da % de LDH extracelular.
- 2.2. Determinação das alterações metabólicas de depleção de GSH, formação de GSSG e peroxidação lipídica .

1.4. ESTRUTURA DE APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação encontra-se dividida em sete partes:

- 1- Fígado - Órgão alvo da toxicidade dos xenobióticos
- 2- Modelos *in vitro* para avaliação da Hepatotoxicidade
- 3- Revisão geral sobre alguns constituintes medicamento em estudo
- 4- Parte experimental e resultados
- 5- Discussão
- 6- Conclusões
- 7- Bibliografia

O Fígado

2. O FÍGADO

2.1. ÓRGÃO ALVO DA TOXICIDADE DOS XENOBIÓTICOS

(Ham, 1975; Junqueira *et al.*, 1990; Plaa *et al.*, 1994; Moslen, 1996)

O fígado, sendo o órgão mais importante no metabolismo dos xenobióticos, é muitas vezes alvo da toxicidade induzida por esses compostos. Este facto implica que nos estudos pré-clínicos que acompanham o desenvolvimento de um novo fármaco, um dos passos da investigação mais importante que se realiza é o despiste ("screening") da hepatotoxicidade. A biotransformação e os efeitos dos xenobióticos sobre funções específicas do fígado são aspectos difíceis de estudar no organismo inteiro, devido à possível interferência de outros órgãos assim como de vários factores endógenos e exógenos. Por estas razões, e por outras mais à frente indicadas, os sistemas *in vitro* são cada vez mais utilizados como uma ferramenta fundamental nos estudos de Farmacotoxicologia. Concretamente, os estudos de hepatotoxicidade poderão ser realizados em hepatócitos isolados, culturas de hepatócitos, fatias de fígado ou fígado isolado perfundido.

Seguidamente vamos descrever as principais razões que fazem do fígado o principal órgão alvo da acção tóxica dos xenobióticos.

O fígado é a maior glândula do organismo, constituindo 2 a 5 % do peso de um animal adulto. Existem no fígado duas vias aferentes do sangue:

- (a) A artéria hepática, um ramo do tronco celíaco, transporta sangue oxigenado (arterial) representando cerca de 25% do sangue que entra no fígado.
- (b) A veia porta transporta o sangue (venoso) que já passou pelos capilares do tracto gastrointestinal, baço e pâncreas, correspondendo aos restantes 75% do sangue que entra no fígado.

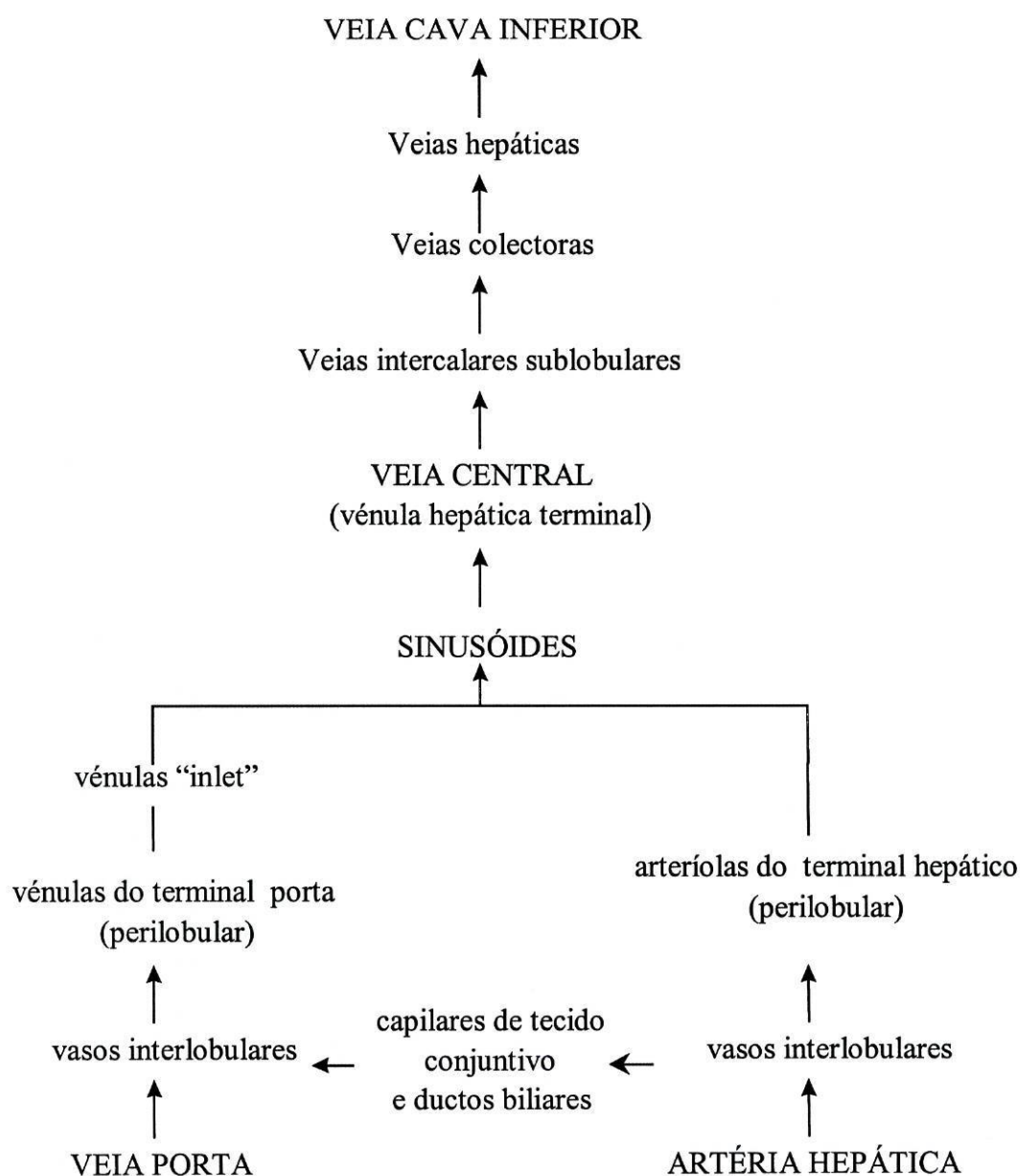
O sangue destes dois vasos mistura-se à medida que vai passando pelos ramos dos vasos sanguíneos e pelos sinusóides hepáticos. O sangue sinusoidal é recebido nas vénulas hepáticas terminais (veias centrais) que se juntam para formar as veias intercaladas e finalmente a veia hepática que leva o sangue ao coração, via veia cava inferior.

Desta forma o fígado actua como um guardião situado entre o tracto digestivo e o resto do corpo. Por causa desta interposição, o sangue que entra no fígado é sujeito a

elevadas concentrações de nutrientes e compostos com potencial toxicidade, tornando o fígado um órgão alvo de toxicidade.

O fígado é o principal órgão armazenador de nutrientes como o glicogénio e sintetizador de importantes moléculas como as proteínas do plasma a partir dos aminoácidos que entram pela veia porta. Está também envolvido no catabolismo e excreção de excedentes ou de moléculas indesejáveis tal como a bilirrubina, excesso de aminoácidos e xenobióticos. A produção da bile pelo fígado constitui a sua função como glândula exócrina.

Figura 1. Representação da circulação hepática.



2.1.1. Morfologia do Fígado

(Ham, 1975; Junqueira *et al.*, 1990; Plaa *et al.*, 1994; Moslen, 1996)

A maior parte do tecido hepático é constituído por hepatócitos (parênquima), tanto em número de células como em volume de espaço que ocupam. No fígado humano, aproximadamente 85% das células são hepatócitos, a maior parte delas localizando-se nos sinusóides. O fígado de rato tem menos hepatócitos (60%) mas estes constituem quase 78% do volume hepático.

A organização do parênquima hepático (hepatócitos) e da sua vascularização resulta num sistema muito eficiente que facilita as trocas entre o sangue e os hepatócitos. Os hepatócitos dispõem-se em placas, sendo cada placa constituída por células dispostas em uma só camada, de forma análoga aos tijolos de um muro. As células que revestem os sinusóides são extremamente porosas. Os produtos do metabolismo dos hepatócitos passam para a bile ou para o sangue.

O fígado desempenha também um papel importante na defesa do organismo contra macromoléculas e determinados microorganismos como por ex. contra bactérias. Os sinusóides são constituídos por quatro tipos de células - as endoteliais - células achatadas típicas dos capilares sanguíneos, - as de Kupffer - células grandes que pertencem ao sistema mononuclear fagocitário, - as células Ito - (também designadas “fat storing cells”) que, têm como principais funções armazenar lípidos e vitamina A e sintetizar colagénio, e as - “pit cells” - células produtoras de células “Natural Killer”, estando estes dois últimos tipos de células localizadas no espaço de Disse. As células de Kupffer, em forma de estrela, existem em vários pontos ao longo do lúmen sinusoidal existindo em maior número na zona periportal (43%) do que na zona perivenosa (29%) com 28% apenas na zona intermédia.

2.1.2. Organização do parênquima hepático

(Ham, 1975; Junqueira *et al.*, 1990; Sasse, 1992; Plaa and Charbonneau, 1994; Moslen, 1996)

Há três conceitos diferentes para descrever quer a orientação espacial das células no fígado, quer as unidades funcionais do parênquima hepático:

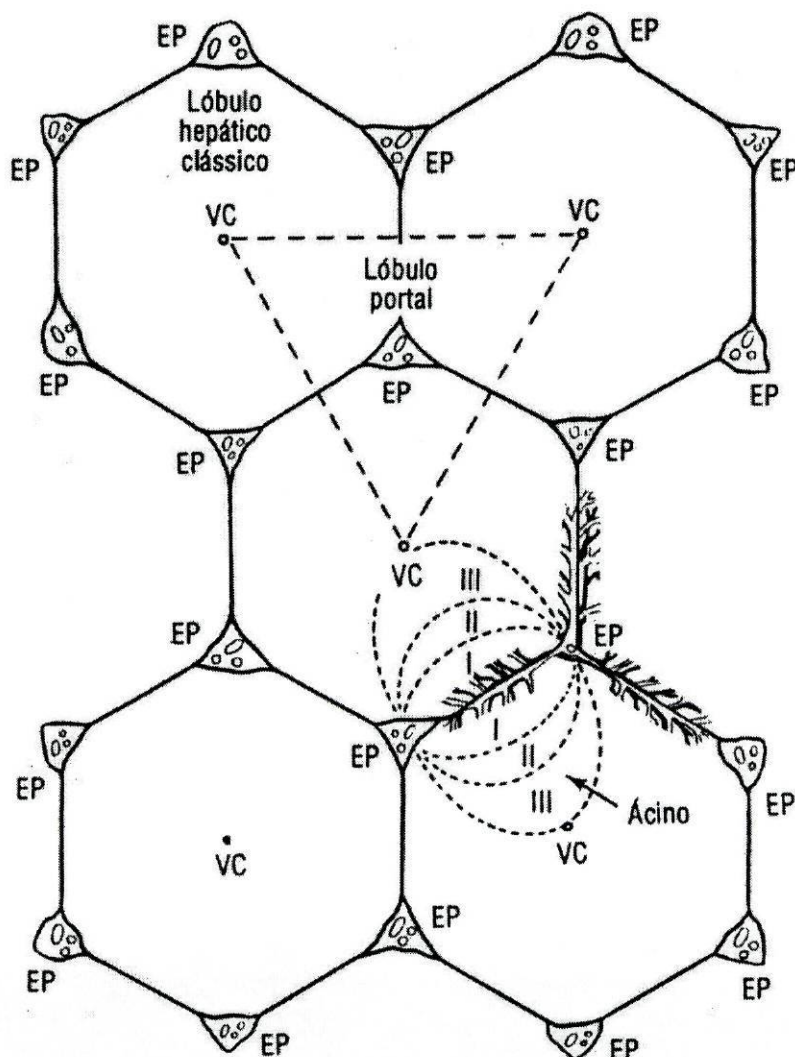
- (a) Lóbulo clássico, descrito em 1664 por Wepfer e dois anos depois por Malpighi, consistindo de um prisma poliédrico de tecido tendo a veia central (VC) como centro. O sangue flui dos espaços porta (EP) pelo lóbulo ao longo dos sinusóides para a veia central, onde é recolhido e retorna à circulação sistémica pela veia hepática. A bile flui em direcção oposta, desde as células parenquimatosas onde se forma e ao longo dos canálculos biliares interlobulares até aos ductos biliares nos espaços porta.
- (b) Lóbulo portal baseado na direcção do fluxo biliar no fígado, tendo por essa razão um espaço porta como centro e uma veia central a demarcar as extremidades de um triângulo, conceito este raramente usado.
- (c) Ácinus hepático baseado na unidade microcirculatória do fígado. Forma a unidade funcional mais pequena do parênquima hepático, estando relacionado com os ramos terminais da circulação aferente.

Em 1954 Rappaport (referido por Ham, 1975) definiu a massa parenquimatosa em termos de unidades funcionais denominadas - ácinus hepático. Um ácinus hepático simples é constituído por uma pequena massa parenquimatosa irregular em que os terminais da veia porta e da artéria hepática se estendem para os espaços porta. Na periferia do ácinus fica a veia central que, por sua vez, fica entre dois ácinus hepáticos. Como a qualidade do sangue que passa através dos sinusóides é alterada por trocas nos hepatócitos, três zonas fisiológicas diferentes, em termos de nutrientes e oxigénio, foram postuladas (a) zona 1 - periportal, à volta do eixo, que é irrigada por sangue contendo elevada quantidade de oxigénio e nutrientes; (b) zona 2 - midzonal, zona intermédia; (c) zona 3 - perivenosa, que recebe sangue que já trocou gases e metabolitos com as células das zonas 1 e 2.

As células que estão na zona 3 são as mais sensíveis à acção dos tóxicos.

A relação entre estas regiões, definidas de diferentes formas, no parênquima hepático está representado na Figura 2.

Figura 2. Representação dos conceitos de definição do parênquima hepático (retirada de Junqueira *et al.*, 1990)



A circulação sanguínea hepática é um factor importante que afecta a actividade metabólica do fígado.

Os processos metabólicos que têm lugar nas três zonas de um ácino são quantitativamente diferentes, o que é extremamente importante e explica o facto de os compostos tóxicos afectarem em grau diferente cada uma das zonas.

A heterogeneidade nos níveis de proteínas ao longo do ácino hepático gera gradientes de funções metabólicas. Os hepatócitos da zona 1 são ricos em mitocôndrias e têm um papel predominante na oxidação dos ácidos gordos, na gluconeogénese, e na destoxicação da amónia em ureia (Timbrell, 1991). Os gradientes das enzimas envolvidas na destoxicação e, por vezes, na bioactivação dos compostos foram observados ao longo do ácino por técnicas imunohistoquímicas (Traber *et al.*, 1988; Jungermann *et al.*, 1989).

Gradientes importantes na expressão da toxicidade de certas hepatotoxinas são os elevados níveis de glutathione e de enzimas com actividade respiratória na zona 1, e do sistema enzimático dependente do citocromo P-450 bem como de enzimas dependentes do NADPH na zona 3 (Plaa and Charbonneau, 1994; Moslen, 1996; Tsutsumi *et al.*, 1989).

Estas diferenças têm um importante papel no estudo e na caracterização dos diferentes mecanismos de acção no desenvolvimento das lesões hepáticas associadas aos agentes hepatotóxicos (Plaa and Charbonneau, 1994).

2.1.3. Fígado - Principal órgão metabolizador

As principais reacções metabólicas que se processam nos organismos são, em grande parte, eminentemente realizadas no fígado.

Quando um dado xenobiótico contacta com o organismo e é absorvido, vai sofrer alterações estruturais por forma a que o organismo se liberte dele mais facilmente. Para que isso seja possível o organismo dispõe de um equipamento complexo de enzimas e cofactores bem como de fontes energéticas que, actuando conjuntamente, têm como principal finalidade a desactivação ou, pelo menos, a diminuição da sua toxicidade, embora, em alguns casos, se obtenha o efeito oposto (Carvalho *et al.*, 1993), o aumento da hidrofília e subsequentemente a sua eliminação.

O processo de biotransformação de um xenobiótico, *in vivo*, ocorre em três fases:

- Reacções de FASE I - também denominadas reacções de funcionalização, incluem reacções de oxidação, redução ou hidrólise e têm a função de converter os xenobióticos em compostos mais polares.
- Reacções de FASE II - também denominadas reacções de conjugação ou biossintéticas, incluem a glucoronidação, a acetilação, a sulfatação, e a conjugação com a glutathione (GSH), ou seja a adição de um grupo polar por forma a aumentar a hidrofília do xenobiótico, facilitando a sua excreção por via renal ou biliar.
- Reacções de FASE III - reacções catabólicas em que o substrato é normalmente o conjugado resultante das reacções de FASE II.

O Quadro 1 esquematiza exemplos de enzimas envolvidas nas reacções de FASE I, II e III.

Quadro 1. Enzimas envolvidas nas reacções de biotransformação.

(dados retirados de Abou-Donia, 1995)

REACÇÃO	ENZIMA	LOCALIZAÇÃO
R. FASE I		
oxidação	oxidases de função mista monoaminoxidases álcool desidrogenases aldeído desidrogenases	Retículo endoplasmático Mitocôndria Citosol Citosol
redução	oxidases de função mista redutases	Retículo endoplasmático
hidrólise	esterases	Citosol Mitocôndria retículo endoplasmático
R. FASE II Conjugação com:		
água	epóxido hidrolase	retículo endoplasmático citosol
glutathiona	GSH- transferases	citosol
glucuronato	glucoroniltransferases	retículo endoplasmático
sulfato	sulfotransferases	citosol
grupo metilo	metiltransferases	citosol retículo endoplasmático
acetato	acetiltransferases	citosol
aminoácidos	AcilCoA: N-aciltransferase do aminoácido	mitocôndria
R. FASE III		
hidrólise	peptidases	retículo endoplasmático
C-S-liase	β- liase	citosol mitocôndria
desaminação	transaminases	citosol

Como resultado desta biotransformação os produtos ficam normalmente preparados para serem eliminados por via renal ou biliar.

De uma forma resumida, as reacções de biotransformação têm como objectivos:

- reduzir a semi-vida biológica dos xenobióticos
- reduzir a duração da exposição do organismo aos xenobióticos
- evitar a acumulação dos xenobióticos no organismo,

alterando, desta forma, a duração e a intensidade da actividade biológica dos xenobióticos.

É importante realçar que, apesar de a maior parte dos compostos serem destoxicados e inactivados por estas reacções, alguns, que *per se* não são tóxicos, podem ser bioactivados originando intermediários reactivos com potencial toxicidade.

Estes intermediários reactivos, juntamente com outros compostos, formam as seguintes classes distintas de iniciadores tóxicos, quimicamente reactivos (vide Quadro 2)

- Compostos electrofílicos
- Radicais livres
- Espécies reactivas de oxigénio
- Policatões
- Metais pesados,

que podem levar ao aparecimento de efeitos nefastos, tais como lesão celular, morte celular, mutagénese ou tumorigénese.

Resumindo, podemos também dizer que as razões que fazem do fígado um dos principais órgãos alvo dos tóxicos são: 1) ser o principal órgão metabolizador de compostos endógenos e exógenos, 2) a sua capacidade para concentrar e biotransformar xenobióticos, 3) ser o órgão secretor da bile, 4) a proximidade anatómica da circulação sanguínea proveniente do tracto digestivo (cerca de 70%) e circulação sanguínea proveniente do coração (cerca de 25% do débito cardíaco).

Quadro 2. Iniciadores tóxicos quimicamente reactivos, tipos de interacções e moléculas biológicas alvo. (adaptado de Vermeulen *et al.*, 1993)

INICIADORES	EXEMPLOS	TIPOS DE REACÇÃO OU INTERACÇÃO	ALVOS
ELECTRÓFILOS	Aceitadores de Michael Quinonas	Ligação covalente	-tióis proteicos e não proteicos
RADICAIS	Tetracloreto de Carbono	ligação covalente	-tióis proteicos e não proteicos; ácidos nucleicos, (fosfo)lípidos
	Halotano	abstracção hidrogénio	-tióis proteicos e não proteicos; ácidos nucleicos, (fosfo)lípidos
ESPÉCIES REACTIVAS DO OXIGÉNIO	Adriamicina O_2^-	redução	- oxigénio molecular
	H_2O_2	redução	- iões metálicos $Fe(III) \rightarrow Fe(II)$
	OH^\cdot	oxidação	-tióis proteicos e não proteicos
		abstracção de hidrogénio	-tióis proteicos e não proteicos; ácidos nucleicos, (fosfo)lípidos
METAIS PESADOS	Cd, Hg, Pb, Pt, Au, Ag	complexação	-tióis proteicos e não proteicos; ácidos nucleicos, (fosfo)lípidos
		oxidação dos grupos SH	
POLICATIÕES	Gentamicina Kanamicina	interacção carga-carga	- fosfolípidos

2.2. MECANISMOS DE LESÃO E/OU MORTE CELULAR

No âmbito deste trabalho é muito importante ter presentes os processos indutores de citotoxicidade e que, portanto, podem ser esclarecidos por ensaios *in vitro* realizados sobre células isoladas.

Os processos que levam ao aparecimento de perturbações nas células e os efeitos por eles provocados podem ser divididos por três estados diferentes: lesões primárias, secundárias e terciárias, algumas delas resultantes de um só efeito tóxico (Timbrell, 1991).

EFEITOS PRIMÁRIOS – efeitos que surgem por acção dos compostos tóxicos nas células, nomeadamente:

- peroxidação lipídica
- ligação covalente a macromoléculas
- alterações no conteúdo de tióis
- inibição enzimática
- isquémia

EFEITOS SECUNDÁRIOS - efeitos que surgem na sequência daqueles que podem conduzir à morte celular. Podem ser alterações estruturais ou bioquímicas, podendo estar ou não interrelacionadas, e algumas são mais uma consequência do que a causa da lesão, nomeadamente:

- alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana
- alterações no citosqueleto
- lesão mitocondrial e inibição das suas funções
- depleção do ATP e de outros cofactores
- alterações na homeostase do Ca^{2+}
- perturbação do DNA
- destabilização lisossomal
- estimulação da apoptose
- lesão do retículo endoplasmático

EFEITOS TERCIÁRIOS – manifestações finais que podem ser observáveis em simultâneo ou sequencialmente após exposição a um composto tóxico:

- esteatose (alterações lipídicas)

- formação de vesículas
- apoptose
- necrose

Os dois primeiros eventos terciários são potencialmente reversíveis enquanto a apoptose e a necrose são duas formas distintas de morte celular. O fígado tem uma elevada capacidade de regeneração tecidual e é capaz de substituir tecido necrótico num curto espaço de tempo. No entanto, a administração crónica repetida de alguns agentes tóxicos como, por ex., o tetracloreto de carbono e o etanol, estimulam, em animais de experiência, a síntese de colagénio dando origem a lesões irreversíveis do tipo fibrótico, de forma semelhante à cirrose no Homem.

Muitas destas expressões de toxicidade só podem ser observadas por recurso a modelos *in vitro*.

2.2.1. Tipos de lesões hepáticas

(Plaa and Charbonneau, 1994; Moslen, 1996)

A lesão hepática observada depende do agente químico envolvido e do período de exposição.

As principais funções hepáticas podem ser afectadas após a ocorrência de agressões resultantes de exposição aguda ou crónica a compostos tóxicos (vide Quadro 3).

Após exposição aguda surge normalmente:

- uma acumulação lipídica nos hepatócitos - fígado gordo (esteatose) - Etanol, CCl_4
- processos degenerativos que, por sua vez, levam à morte celular (necrose) - Paracetamol, etanol, Cu.
- e disfunção hepatobiliar (colestase) - Etanol, estrogénios.

À exposição crónica estão normalmente associadas:

- alterações cirróticas - Arsénio, etanol, vitamina A.
- alterações neoplásicas - Aflatoxinas, androgénios.

Algumas formas de lesão hepática são reversíveis (como a esteatose ou a formação de vesículas), enquanto outras resultam numa permanente desorganização estrutural e funcional do órgão.

Quadro 3. Principais funções do fígado e consequências da alteração dessas funções.

(adaptado de Moslen, 1996)

TIPO DE FUNÇÃO	EXEMPLOS	CONSEQUÊNCIAS DAS ALTERAÇÕES
Homeostasia de Nutrientes	Síntese e armazenamento da glucose	Hipoglicemia, confusão
	Captação do colesterol	Hipercolesterolemia
Filtração de partículas	Produtos de bactérias intestinais (ex., endotoxinas)	Endotoxemia
Síntese proteica	Factores de coagulação	Hemorragia
	Albumina	Hipoalbuminemia, ascites
	Proteínas de transporte (ex., VLDL)	Fígado gordo
Biotransformação e destoxicação	Bilirrubina e amônia	Icterícia, coma relacionado com hiperamoniemia
	Hormonas esteróides	Perda de características masculinas
	Xenobióticos	Diminuição do metabolismo dos compostos
Formação da bile e excreção biliar	Captação dependente dos ácidos biliares de lípidos e proteínas	Diarreia gorda, malnutrição, deficiência em Vit.E
	Bilirrubina e colesterol	Icterícia, hipercolesterolemia
	Metais, ex., Cu e Mn	Neurotoxicidade induzida pelo Mn
	Xenobióticos	Atraso na clearance

2.2.1.1. Peroxidação lipídica

Uma vez que alguns dos constituintes do “Prelus” induzem, em determinadas concentrações e condições do organismo, stress oxidativo e peroxidação lipídica (nomeadamente, o etanol e o isoproterenol), descreve-se em seguida o mecanismo desencadeador de stress oxidativo e de peroxidação lipídica que pode acontecer no fígado e em outros órgãos.

O stress oxidativo desencadeia-se quando há uma alteração da relação pró-oxidante/antioxidante em favor da acção pró-oxidante (Sies, 1991). Este fenómeno ocorre em diversas patologias hepáticas, participando activamente nos mecanismos de hepatotoxicidade de diversos compostos (como p.ex., tetracloreto de carbono, diquat, paraquat, paracetamol, etanol). Na acção pró-oxidante participam espécies reactivas de oxigénio (ROS), as quais compreendem radicais e formas moleculares de oxigénio. Os radicais são espécies capazes de existência independente que contêm um ou mais electrões desemparelhados, que, por sua vez se encontram isolados numa orbital (Halliwell, 1991, Halliwell *et al.*, 1995). As formas moleculares de oxigénio são moléculas que possuem alta reactividade, pela qual podem dar origem a radicais (p.ex., peróxido de hidrogénio (H_2O_2)).

O O_2 apresenta-se na forma dirradicalar, ou seja, com dois electrões desemparelhados, devendo, por isso, ser representado por $O_2^{2\cdot}$ (Koppenol, 1997) ou $\cdot\underline{O}-\underline{O}\cdot$ (Bast *et al.*, 1991). Apesar da sua natureza dirradicalar, as restrições de natureza mecânico-quântica não permitem grande reactividade ao $O_2^{2\cdot}$. Físico-quimicamente, o $O_2^{2\cdot}$ apenas reage por activação fotodinâmica, ou, então, por perda sequencial de um electrão até quatro electrões (Figura 3) (Gille and Sigler, 1995).

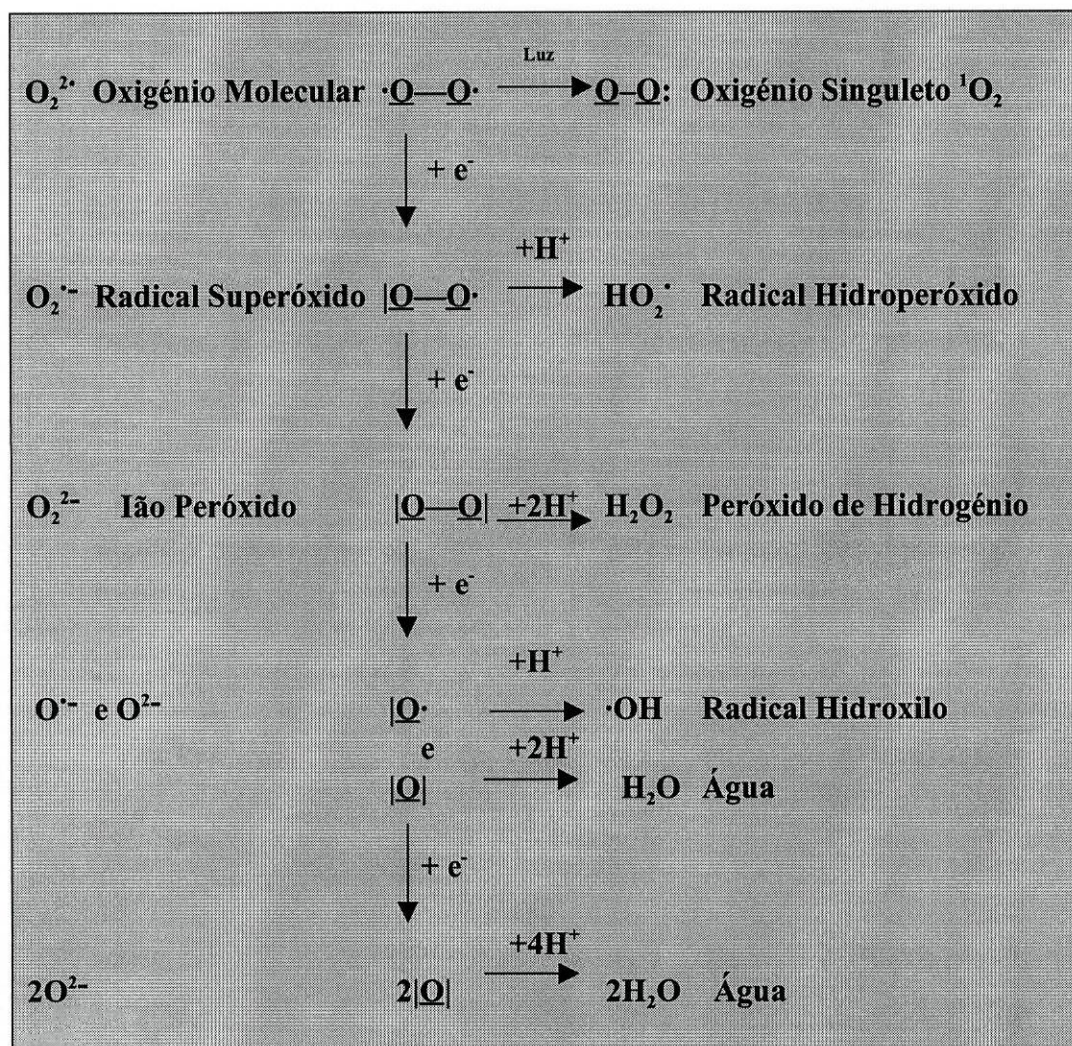
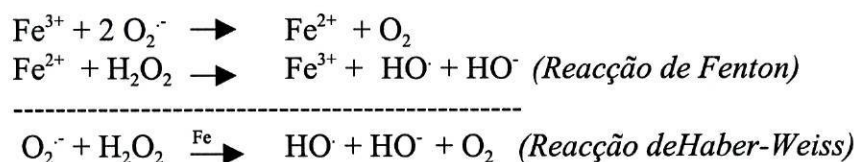
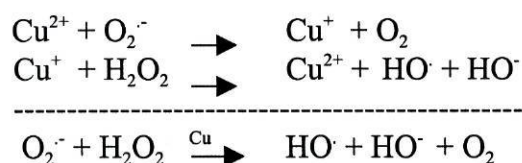


Figura 3. Redução univalente sequencial do $O_2^{2\cdot}$ (Adaptado de Gille and Sigler, 1995, por Remião, 1998b)

Na Figura 3 podemos observar a formação das diferentes ROS, quer pela acção fotodinâmica com produção do oxigénio no estado de singuleto ($^1\text{O}_2$ ou $\text{O}=\text{O}: \text{Oxigénio Singuleto}$) quer pela redução univalente sequencial do O_2 , até quatro electrões, com formação do anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 e do $\text{HO}\cdot$. De entre os elementos referidos a espécie oxidante mais reactiva é o $\text{HO}\cdot$. A formação deste radical ocorre facilmente no organismo na presença de metais de transição, tais como o ferro:



e o cobre:



O HO[·] possui um tempo de semi-vida curto de onde resulta uma capacidade de difusão limitada, reagindo, por isso, com a molécula mais próxima do local da sua formação.

Normalmente, as ROS actuam pela abstracção de um hidrogénio das ligações saturadas dos ácidos gordos insaturados presentes nas membranas celulares. Deste processo resulta a peroxidação lipídica (Figura 4) onde o radical lipídico formado (L[·]) é convertido sucessivamente a radical peroxilo (LOO[·]) pela entrada de O₂, a hidroperóxido (LOOH) pela abstracção de um hidrogénio e a radical alcóxido (LO[·]) pela reacção de Fenton. A consequente fragmentação dá origem a hidrocarbonetos como o etanol e a aldeídos como o 4-hidroxinonenal e o malonildialdeído.

O ciclo reactivo da peroxidação lipídica induz, assim, além da destruição das membranas lipídicas, a formação de ROS e outros compostos electrofílicos (p.ex., o 4-hidroxinonenal).

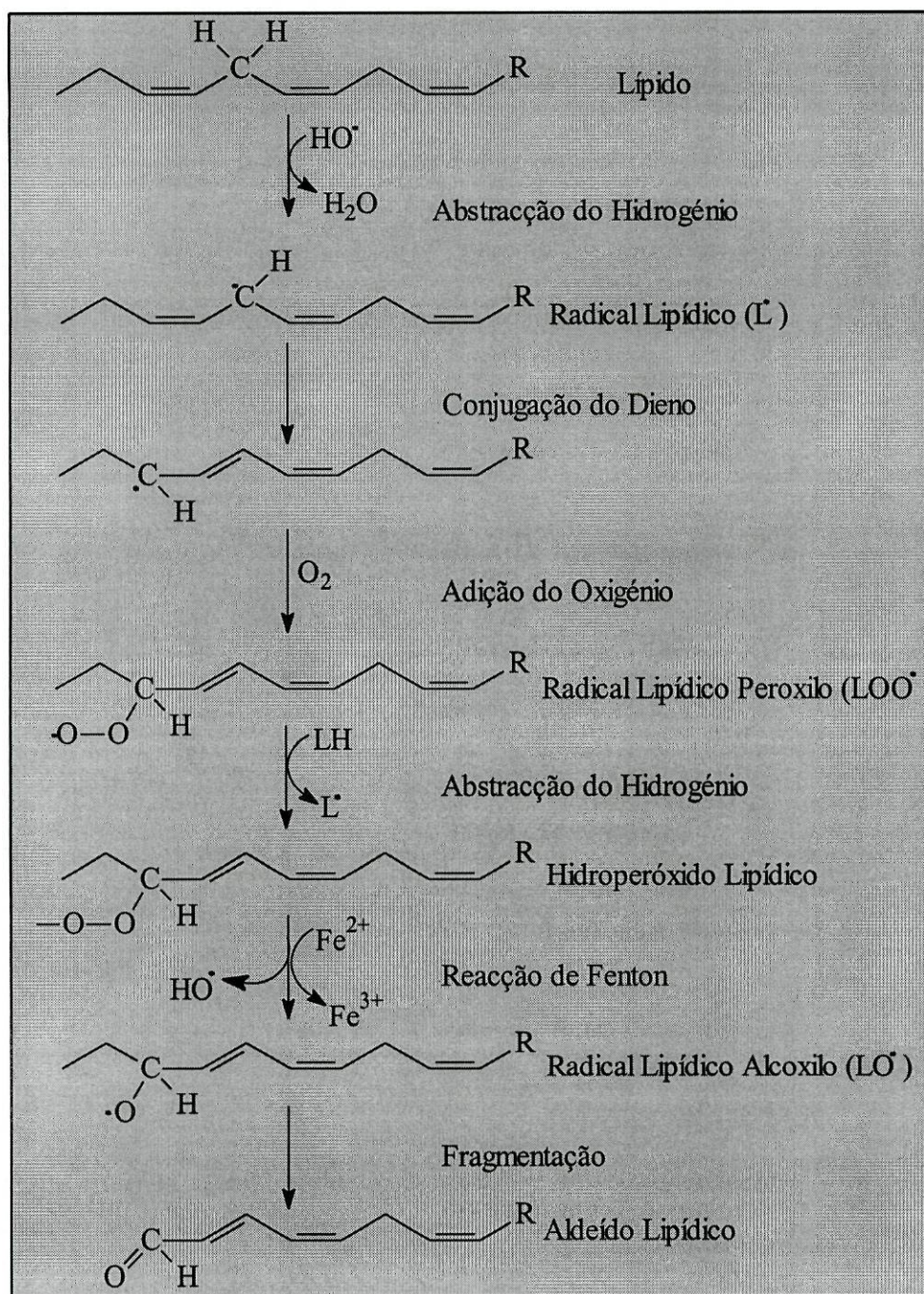


Figura 4. Peroxidação lipídica (adaptado de Gregus and Klaassen, 1996, por Remião, 1998b)

O organismo humano está, no entanto, equipado de modo a controlar a actividade pró-oxidante. Para tal existem antioxidantes, definidos como substâncias que, presentes em pequenas concentrações comparativamente às dos substratos oxidáveis, evitam ou atrasam a oxidação desses substratos. Os antioxidante podem dividir-se em antioxidante enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos, dos quais se referem brevemente alguns.

2.3. ANTIOXIDANTES

2.3.1. Antioxidantes enzimáticos

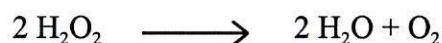
2.3.1.1. Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase

A superóxido dismutase (SOD) está presente no citosol e mitocôndria e é responsável pela remoção de radicais superóxido resultando na produção de peróxido de hidrogénio:



Pode conter diferentes grupos prostéticos metálicos. Os mais comuns são o Cu e Zn presentes na enzima citoplasmática e o Mn na enzima mitocondrial (Kaul *et al.*, 1993)

O produto reactivo (H_2O_2) pode ser removido por acção da peroxidase da GSH ou da catalase, presente nos peroxissomas:



É de realçar que a nível mitocondrial não existe a catalase e, por isso, apenas a peroxidase da GSH metaboliza o H_2O_2 neste organelo. No citoplasma a peroxidase da GSH é mais activa que a catalase para concentrações da ordem dos micromolar (Kaul *et al.*, 1993)

2.3.2. Antioxidantes não enzimáticos endógenos

2.3.2.1. Vitamina E

Quimicamente, a vitamina E é uma mistura de quatro tocoferóis lipossolúveis. O mais importante é o α -tocoferol. Nas células existem em concentrações relativamente elevadas na membrana plasmática e na membrana mitocondrial. Esta molécula possui um hidroxilo cujo átomo de hidrogénio é facilmente removido e se conjuga com o radical peroxilo (LOO^{\cdot}) ou alcóxilo (L^{\cdot}):

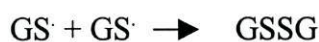
propriedades bioquímicas da molécula (DeLeve and Kaplowitz, 1991). De facto, em virtude da sua reactividade devida ao grupo SH presente no resíduo de cisteína, a GSH tem um papel importante na manutenção da homeostase celular e na protecção contra vários agressores celulares. Tem como particularidade a ligação entre o grupo amina do resíduo de cisteína e o grupo carboxilo ligado ao átomo de carbono γ do ácido glutâmico, que o torna resistente à degradação pelas peptidases, excepto pela γ -glutamyltranspeptidase, situada especialmente em algumas membranas celulares, nomeadamente nos rins, pâncreas, intestino e fígado. Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG: forma oxidada da GSH). Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutathiona total (< 5%) (Gérard-Monnier, 1996; Liebler and Reed, 1997).

A GSH está omnipresente na célula onde tem um papel crucial não só a desactivar ROS, como também a reverter alterações bioquímicas tóxicas já ocorridas (Boobis *et al.*, 1991). A sua depleção em culturas de hepatócitos pode levar à morte celular (Carvalho *et al.*, 1993). As mitocôndrias têm a sua própria “pool”, de importância crucial na sua protecção contra a acção das ROS e na viabilidade celular (Liebler and Reed, 1997).

A GSH pode reagir com as ROS de duas formas: (1) actuar como redutor, originando GSSG e H_2O mediante reacção catalisada pela peroxidase da GSH, ou (2) reagir directamente com os radicais levando à formação do radical glutathiona tiilo (GS^\cdot):



O radical glutathiona tiilo poderá dimerizar e formar GSSG:



A GSSG pode ser reduzida a GSH por acção da enzima redutase da glutathiona e com gasto de NADPH:

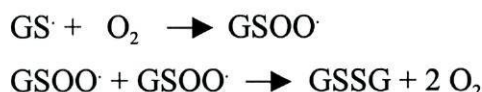


A GSH contribui para a manutenção do equilíbrio sulfidrílo-dissulfureto proteico e do potencial redox celular através da sua acção antioxidante. Este potencial é essencial para a funcionalidade de certas proteínas, nomeadamente enzimas, como as ATPases

dependentes do Ca^{2+} , que funcionam como bombas de cálcio ligadas à membrana citoplasmática e microsomal e que mantêm controlados os níveis plasmáticos de Ca^{2+} livre.

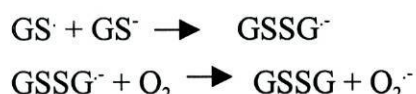
A GSH pode, no entanto, actuar como pró-oxidante e poderá fazê-lo de duas formas:

- o radical tiilo pode reagir com o O_2 com formação do radical peroxissulfonilo (GSOO^\cdot):



em que o O_2 final pode encontrar-se no estado de singuleto (Wefers and Sies 1988; Bast *et al.*, 1991)

- ou, ainda, originando $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Gregus and Klaassen, 1996):



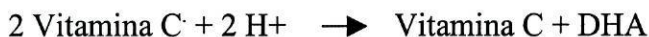
A GSH funciona como sequestrador nucleofílico de vários compostos e dos seus metabolitos, através de mecanismos químicos e enzimáticos, ligando-se covalentemente a centros electrofílicos e, tal como já foi referido, está envolvida na regeneração da vitamina E e na inibição da peroxidação lipídica.

Por todas estas acções conclui-se que a GSH tem um papel muito importante na defesa celular e a sua depleção pode resultar numa exacerbação da toxicidade provocada pelos xenobióticos. É portanto de grande significado toxicológico a monitorização dos seus níveis celulares.

2.3.2.3. Vitamina C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é um antioxidante hidrossolúvel existente no citoplasma e no fluido extracelular, em concentrações da ordem

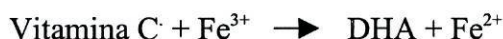
das micromoles. As suas propriedades químicas permitem-lhe interagir directamente com as ROS originando diidroascorbato (DHA):



ou então, actuar directamente pela regeneração da vitamina E a partir do radical tocoferilo (Wefers and Sies, 1988). Reage, ainda, com o Fe^{2+} e o Cu^+ de modo a prevenir a formação de ROS pela reacção de Fenton (Kaul *et al.*, 1993).

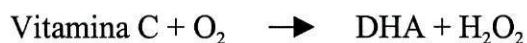
De notar, no entanto, que em experiências *in vitro* a vitamina C pode exercer acções pró-oxidantes (Halliwell, 1996a). Por ex., na presença de ferro, a vitamina C na concentração de 0,2 mM induz fortemente a peroxidação lipídica (Bast *et al.*, 1991). A ocorrência deste fenómeno pode ter duas origens:

- redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} :



onde o Fe^{2+} poderá catalizar a reacção de Fenton;

- formação de H_2O_2 , pela reacção:



2.3.2.4. Ácido úrico

Nas concentrações em que se encontra no plasma, o urato reage com os radicais HO^\cdot e ROO^\cdot exercendo, assim, acção antioxidante (Ames *et al.*, 1981; Halliwell, 1996b). Parece, ainda, proteger o ascorbato da oxidação (Kaul *et al.*, 1993; Halliwell, 1996b).

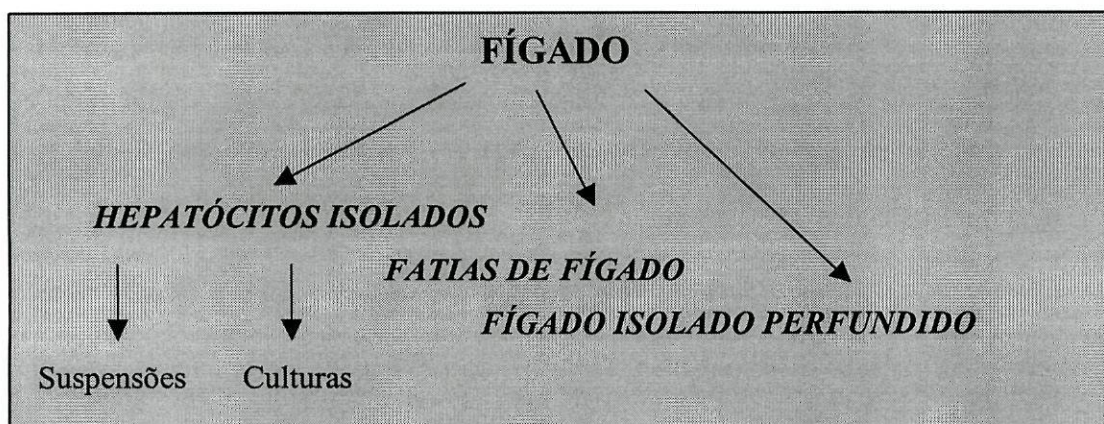
Resumidamente, podemos, então, considerar que os mecanismos de protecção celular contra a agressão dos xenobióticos são a biotransformação dos compostos em

metabolitos mais polares, p.ex., pelas reacções de fase I e II, ou da conversão de metabolitos reactivos em estruturas mais estáveis, p.ex., epóxidos a dihidrodíóis, e os mecanismos específicos de destoxicação por acção dos antioxidantes que acabaram de ser descritos.

*Modelos In Vitro para Avaliação da
Hepatotoxicidade*

3. MODELOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA HEPATOTOXICIDADE

Estão implementados e aceites pela comunidade científica vários modelos *in vitro* para avaliação da hepatotoxicidade, nomeadamente:



Neste trabalho pretende-se apenas aprofundar o modelo *in vitro* que utiliza células recentemente isoladas em suspensão, tendo sido este o modelo escolhido para a parte experimental desta dissertação. A título referencial resume-se alguns aspectos relacionados com outros modelos utilizados para estudos de hepatotoxicidade, que consideramos de maior relevância. Cada modelo tem as suas potencialidades e limitações, e a escolha do modelo apropriado deve ser baseada no problema específico que se pretende resolver.

3.1. FATIAS DE FÍGADO COMO MODELO *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE

As fatias de fígado têm sido extensivamente usadas nos últimos 50 anos em estudos bioquímicos e farmacológicos mas apenas em experiências de curta duração. Os principais problemas com este modelo resultaram de inconsistências no corte das fatias e na deficiente técnica de incubação. Estes problemas foram sendo ultrapassados com o desenvolvimento tecnológico, após a introdução de um sistema eficaz de corte das fatias de fígado com elevada precisão e com o desenvolvimento de novas técnicas de incubação por forma a manter a sua viabilidade (Smith *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986).

Desta forma, as fatias de fígado passaram também a ser usadas como uma ferramenta *in vitro* para estudar a hepatotoxicidade dos compostos.

As fatias de fígado podem ser preparadas a partir de várias espécies animais, incluindo o Homem, usando dispositivos mecânicos de corte que produzem fatias com uma espessura uniforme, de forma reprodutível, otimizando desta forma as trocas de nutrientes

e gases. As fatias são incubadas num sistema dinâmico que as mantém viáveis em cultura por 1 a 10 dias.

3.1.1. Potencialidades das fatias de fígado como modelo *in vitro*

(Parrish *et al.*, 1995; Gandolfi *et al.*, 1996)

- Pelo facto de a arquitectura celular do fígado não ser alterada, as fatias de fígado mantêm as suas propriedades bioquímicas, hormonais e funcionais permitindo:
 - o uso de marcadores específicos das células como indicadores do local de lesão hepática, ou detecção de lesões em áreas específicas do lóbulo hepático.
 - a biotransformação dos xenobióticos nas fatias de fígado virtualmente da mesma forma que no fígado *in vivo*.
 - o estudo do metabolismo dos substratos endógenos ou exógenos, sendo esta, provavelmente, a aplicação mais importante deste modelo.
 - a correlação das alterações bioquímicas/funcionais com alterações histopatológicas.
- Uma vez que a maior parte dos compostos tóxicos produz lesões nas fatias de fígado no mesmo local que produziriam no fígado *in vivo*, este modelo permite a realização de estudos mecanísticos de toxicidade detalhados que não são possíveis com outros sistemas *in vitro* ou *in vivo* (análises múltiplas acopladas com avaliações histopatológicas).

3.2. FÍGADO ISOLADO PERFUNDIDO COMO MODELO *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE

A preparação de fígado isolado perfundido mereceu a maior atenção pelo facto de preservar a sua funcionalidade para estudos bioquímicos, farmacológicos e toxicológicos (Mehendale, 1994).

As primeiras tentativas para obter este tipo de preparação com viabilidade foram marcadas por várias dificuldades, tais como o uso de um meio de perfusão aquoso como a solução de Ringer, em lugar de sangue total, a falta de dispositivos adequados para filtrar pequenos coágulos de fibrina que impediam a circulação hepática e a inexistência de anticoagulantes não tóxicos como a heparina, o que impedia estudos para além de 1 a 2 horas.

O rato é o animal de escolha para fornecer esta preparação mas outras espécies têm também sido usadas como o macaco, coelho, gato e ratinho.

3.2.1. Potencialidades e Limitações das técnicas com fígado isolado perfundido

3.2.1.1. Potencialidades

- Permitem avaliar o papel desempenhado pelo fígado na disposição, nomeadamente na metabolização de compostos endógenos ou exógenos porque mantêm a sua integridade estrutural funcional.
- Contrariamente aos estudos efectuados num animal inteiro, estas técnicas permitem controlar vários parâmetros como p. ex., a pressão de perfusão, o fluxo sanguíneo e a concentração dos compostos a estudar (permitindo estudar um largo intervalo de concentrações, incluindo concentrações que *in vivo* provocariam a morte do animal).
- Vários "end-point" podem ser avaliados, estando estes próximos da situação *in vivo*, o que permite uma extrapolação mais realista dos resultados para a situação *in vivo*.

3.2.1.2. Limitações

- Estas preparações são mantidas com integridade bioquímica e fisiológica por um curto período de tempo, sendo esta a principal limitação destes modelos, pois permitem apenas estudos toxicológicos e mecanísticos de compostos que actuam rapidamente ao nível do órgão.
- A implementação e condução de experiências com estes sistemas tem que ser realizada por técnicos especializados e treinados em todos os aspectos dos procedimentos cirúrgicos, bem como nos aspectos técnicos do equipamento associado.
- O principal argumento a favor destes estudos é o facto de o órgão manter a sua integridade celular, as barreiras naturais e as interrelações complexas e dinâmicas entre as células, mas este mesmo argumento poderá em certos estudos corresponder a uma

limitação quando se pretende estudar particularmente determinado tipo de células hepáticas.

- Um animal intacto fornece geralmente uma única preparação viável por poucas horas, o que significa o sacrifício de muitos animais para a realização de um estudo de toxicidade.

3.3. CULTURAS DE HEPATÓCITOS COMO MODELO *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE

As culturas de hepatócitos são extensamente usadas em estudos de hepatotoxicidade.

A vantagem dos sistemas constituídos por culturas de hepatócitos (extensiva às suspensões de hepatócitos) é a de se poder combinar os estudos de citotoxicidade com outras determinações bioquímicas e/ou com o co-tratamento com inibidores metabólicos, por forma a permitir o estudo dos mecanismos de toxicidade que não são facilmente executados *in vivo*, ou usando sistemas subcelulares, como as preparações microsossomais (Charbonneau *et al.*, 1986).

A avaliação da citotoxicidade é, provavelmente, a determinação mais frequentemente efectuada nas culturas de hepatócitos.

Uma variedade de parâmetros têm sido desenvolvidos para avaliar e quantificar a citotoxicidade em culturas de hepatócitos.

3.3.1. Morfologia das células

Nas culturas em monocamadas as células exibem uma forma poligonal e núcleo proeminente. Ao microscópio óptico, a citotoxicidade pode ser visualizada através do aspecto arredondado das células e da formação de vesículas. Ao microscópio electrónico, a citotoxicidade pode ser observada pelas alterações ultraestruturais, como por exemplo o espessamento da membrana mitocondrial ou o aparecimento de corpos de inclusão microsossomais.

3.3.2. Teste de Exclusão do Azul de Tripiano

Este teste é muitas vezes usado como técnica de rotina para determinar a viabilidade e o crescimento celular durante o isolamento e a cultura dos hepatócitos. De um modo geral, a exclusão do corante é expressa como o número de células coradas, dividindo pelo número total de células contadas. Um aumento significativo desta relação sobre culturas tratadas ou não tratadas poderá revelar citotoxicidade.

3.3.3. Liberação de enzimas citoplasmáticas

É possível inferir pela acção citotóxica de compostos através da libertação de enzimas citoplasmáticas para o meio extracelular. Enzimas como a alaninoaminotransferase (ALT), a aspartatoaminotransferase (AST) e a desidrogenase láctica (LDH) existem no citoplasma dos hepatócitos e são usadas como marcadores de citotoxicidade quando estão presentes no meio extracelular (meio de cultura). Tanto a AST como a ALT existem no citoplasma dos hepatócitos mas, a nível mitocondrial, existe apenas a AST. Esta diferença permite, pela análise destas duas enzimas, distinguir entre lesões na membrana plasmática e lesões na membrana mitocondrial. Também em experiências *in vivo* a elevação dos níveis plasmáticos destas enzimas reflecte a presença de lesões da função hepática.

A elevação dos níveis de LDH no plasma, em ensaios *in vivo*, não indica necessariamente a existência de lesão hepática devido à sua presença ubíqua em outras células. No entanto, em condições *in vitro*, usando apenas os hepatócitos, a libertação de LDH para o meio de cultura reflecte a ruptura da membrana plasmática.

Os resultados da libertação de enzimas para o meio extracelular são normalmente apresentados como uma percentagem do conteúdo total da enzima citoplasmática, usando um tratamento com um detergente (p. ex., Triton X-100) para induzir 100% de lise celular.

3.4. HEPATÓCITOS ISOLADOS

As suspensões de hepatócitos isolados, e as culturas de hepatócitos, são os sistemas *in vitro* mais utilizados quando se pretende estudar o metabolismo dos compostos e a sua

hepatotoxicidade embora as fatias de fígado, na última década, tenham também sido cada vez mais utilizadas como modelo em diversos estudos de toxicidade (Goethals *et al.*, 1994).

A qualidade da informação proveniente deste tipo de modelos *in vitro* depende de vários factores:

- o sistema *in vitro* tem que manter, durante um determinado período de tempo, as características bioquímicas do fígado, nomeadamente as que são necessárias para o estudo que se pretende fazer,
- os parâmetros usados para avaliar os efeitos hepatotóxicos *in vitro* terão que incluir não só a morte celular mas, essencialmente, indicadores bioquímicos da alteração das funções hepáticas.

A estratégia a seguir para o estabelecimento de um protocolo para o despiste ("screening") da hepatotoxicidade envolve a exposição dos hepatócitos ao xenobiótico em diferentes concentrações, durante diferentes períodos de tempo.

Dois tipos de efeitos podem ser avaliados:

EFEITOS CITOTÓXICOS - permitem determinar a concentração de xenobiótico mais elevada que é compatível com a sobrevivência das células.

- viabilidade (sobrevivência) dos hepatócitos;
- perda de enzimas citoplasmáticas (ex., LDH, AST, ALT);
- caracterização morfológica e ultraestrutural;
- alquilação do DNA e RNA.

EFEITOS METABÓLICOS – permitem avaliar os efeitos dos xenobióticos nas funções específicas do fígado.

- metabolismo dos hidratos de carbono;
- ureogénese;
- síntese e secreção proteica;
- metabolismo dos triglicerídeos;

- captação dos ácidos biliares;
- concentração de glutathione;
- regulação e expressão das enzimas envolvidas na Fase I e na Fase II do metabolismo.

A libertação da enzima citoplasmática - LDH - para o meio extracelular, que é devida a alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, é o parâmetro mais utilizado, na prática, para uma avaliação rápida e sensível da citotoxicidade induzida por xenobióticos.

Em termos de indicadores metabólicos, os mais utilizados incluem a síntese e a secreção das proteínas, o metabolismo dos hidratos de carbono (conteúdo em glicogénio, gluconeogénese, produção de ácido láctico), o metabolismo dos lípidos (síntese e secreção dos triglicerídeos, oxidação dos ácidos gordos), e o metabolismo dos xenobióticos incluindo as enzimas envolvidas nas reacções de Fase I (por ex., monooxigenases dependentes do Citocromo P450) e de Fase II.

3.4.1. Potencialidades e Limitações deste modelo

3.4.1.1. Potencialidades do uso de hepatócitos isolados em estudos toxicológicos

As principais potencialidades do uso de hepatócitos isolados em suspensão em estudos toxicológicos (Moldéus *et al.*, 1978; Klaassen and Stacey, 1982; Berry *et al.*, 1992; Blaabouwer, 1992; Schiller *et al.*, 1992) são:

- As suspensões de hepatócitos são um dos modelos ideais para estudo da biotransformação dos xenobióticos e avaliação dos processos de bioactivação ou destoxicação dele resultantes. Permite, portanto, o estabelecimento do perfil metabólico dos xenobióticos. Além disso, é possível relacionar determinados tipos de lesões com os metabolitos formados.
- A relativa facilidade com que se obtêm os hepatócitos isolados faz com que este tipo de células seja usado não só para o estudo dos efeitos de um composto em parâmetros de citotoxicidade não específicos do fígado como também para funções específicas dos hepatócitos.

- Através dos resultados obtidos na determinação de certos parâmetros biocinéticos de um dado composto é possível, com uma certa segurança, extrapolá-los para o organismo inteiro e prever o seu comportamento biocinético *in vivo*, para a mesma espécie.
- É possível, por manipulação da constituição do meio da suspensão, investigar sobre a susceptibilidade celular face a modificações exógenas bem definidas.
- Usando hepatócitos isolados humanos obtém-se informação concreta e específica sobre os potenciais efeitos dos xenobióticos no Homem e pode estabelecer-se o melhor modelo animal para estudos *in vivo* nos animais de experiência.
- Do ponto de vista ético, os ensaios com hepatócitos isolados permitem uma diminuição considerável do número de animais usados no laboratório, uma vez que um só animal pode proporcionar vários estudos.

3.4.1.2. Potencialidades dos ensaios com hepatócitos isolados em suspensão em relação a outros sistemas hepáticos (Klaassen and Stacey, 1982; Blaabouer, 1992)

- As fatias de tecido hepático apresentam uma insuficiente performance metabólica, provavelmente devido ao aparecimento de células danificadas no perímetro das fatias e à falta de oxigenação adequada nas células mais internas.
- As fracções subcelulares podem fornecer conclusões erradas uma vez que a capacidade metabólica global da célula se perdeu.
- Comparando com as linhas celulares, os hepatócitos isolados têm a vantagem de manter, num grau considerável, certos aspectos morfológicos e bioquímicos do fígado intacto.
- Contrastando com as experiências *in vivo* ou com as que usam o fígado isolado perfundido, variáveis como o fluxo sanguíneo, a presença de mais do que um tipo de células, e de factores hormonais, neuronais ou humorais, são eliminados.

3.4.1.3. Limitações dos ensaios com hepatócitos isolados em suspensão em relação a outros sistemas hepáticos (Berry *et al.*, 1992; Blaabouer, 1992; Plaa and Charbonneau, 1994)

- Os hepatócitos em suspensão permitem apenas estudos de toxicidade de curta duração, uma vez que as características estruturais e bioquímicas se mantêm apenas por algumas horas (cerca de 6 horas).
- O isolamento das células conduz a perda da estrutura lobular, remove a sua polaridade e impede a secreção para a bile de qualquer composto, e dos gradientes da concentração de oxigénio, podendo ter algum efeito na avaliação da toxicidade no órgão.
- A expressão de toxicidade relacionada com a comunicação celular não pode, também, ser averiguada.

3.5. EXTRAPOLAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE ESPÉCIES

Um dos factores que influencia a diferente sensibilidade entre as espécies à acção tóxica dos compostos é o facto de poderem existir diferenças na disposição dos mesmos, em particular nos processos de metabolismo dos xenobióticos entre as espécies. As suspensões e as culturas de hepatócitos de múltiplas espécies são um sistema experimental atractivo para avaliar este fenómeno, especialmente como um sistema que permite extrapolar para o Homem resultados obtidos em animais de laboratório, precisamente por ser o fígado o principal órgão metabolizador dos xenobióticos.

Li, em 1994, sugere um "parallelogram approach" (vide Figura 6) para extrapolar para o Homem os resultados obtidos em experiências com animais de laboratório, em culturas de células animais, ou com células humanas (*in vitro*) com os seguintes objectivos:

- demonstrar correlação *in vitro-in vivo* com animais de experiência.
- prever a toxicidade no Homem a partir de resultados obtidos *in vitro* em células humanas.

Conhecendo a relação entre hepatócitos de diferentes espécies e os resultados *in vivo* em animais de laboratório, poderemos também prever os resultados *in vivo* no Homem.

O sucesso da aplicação deste "parallelogram approach" está dependente da capacidade de as culturas de hepatócitos reterem a diferença entre espécies encontrada *in vivo*. Vários resultados já publicados indicam esta capacidade no que respeita ao metabolismo dos xenobióticos (Weisburger *et al.*, 1964; Dring *et al.*, 1970; Green *et al.*, 1986; Mennes *et al.*, 1994) e demonstram, então, a grande utilidade dos hepatócitos isolados na avaliação das diferenças entre as várias espécies no metabolismo. Isto é especialmente importante nos estudos que envolvem o metabolismo no Homem porque as experiências toxicológicas *in vivo* raramente são possíveis de realizar no humano.

<i>In Vivo Toxicity</i>	X	X	X	Previsível
<i>In Vitro Toxicity</i>	X	X	X	X
	Ratinho	Rato	Macaco	Homem

Figura 6. "Parallelogram approach" para extrapolação da toxicidade para o Homem. A resposta que se prevê *in vivo* no Homem (p. ex., metabolismo, toxicidade) é derivada dos resultados obtidos *in vitro* com hepatócitos humanos baseada na relação *in vitro* - *in vivo* observada em animais de laboratório. A chave para esta aproximação é dispor de um vasto conhecimento dos resultados obtidos nos animais de laboratório, preferencialmente usando várias espécies animais. Uma grande vantagem desta aproximação é o facto de se poder usar suspensões e culturas de hepatócitos para seleccionar qual a espécie animal com o perfil metabólico mais aproximado ao do Homem e depois prosseguir os estudos em modelos *in vitro* retirados dessa mesma espécie ou estudos realizados no animal intacto (adaptada de Li, 1994).

Revisão Geral de Alguns Constituintes do Prelus

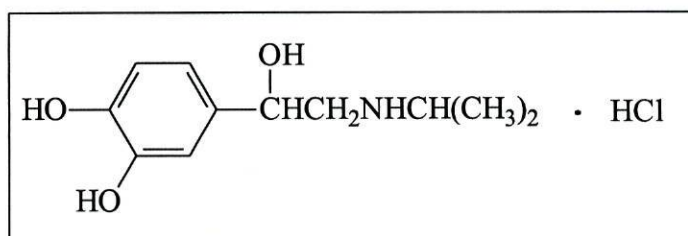
4. REVISÃO GERAL

4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS, FARMACOLÓGICAS, FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS (CONHECIDAS) DE ALGUNS COMPONENTES DO “PRELUS-ELIXIR COMPOSTO”

4.1.1. Cloridrato de isoproterenol

Denominação química: cloridrato de 1-(3,4-di-hidroxifenil)-2-isopropilaminoetanol.

Estrutura química:



Outros sinónimos: cloridrato de isoprenalina, cloridrato de isopropilarterenol, cloridrato de isopropilnoradrenalina.

Descrição: Pó cristalino branco, ou quase branco, de sabor amargo. Escurece lentamente com a exposição ao ar e à luz.

Fórmula molecular: $C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl$

Massa relativa: 247,7

Solubilidade: muito solúvel em água (1 g em menos de 1 ml de água), solúvel no etanol (1 g em cerca de 50 ml de etanol), praticamente insolúvel em clorofórmio e em éter.

Ponto de fusão: 165-170°C com decomposição.

Constante de dissociação: $pK_a = 8,6; 10,1; 12,0$

(Moffat, 1986; Budavary *et al.*, 1989; Reynolds, 1996; FP VI, 1997)

O isoproterenol é um potente broncodilatador. É uma amina simpaticomimética de origem sintética, estruturalmente semelhante à adrenalina, com uma potente acção β -agonista, quer ao nível dos receptores β_1 quer dos receptores β_2 , apresentando uma acção mínima ou mesmo nula sobre os receptores α -adrenérgicos (O'Rourke and Crone, 1984; Gilman, 1996; Reynolds, 1996)

Os principais efeitos sistémicos do isoproterenol incluem o relaxamento da musculatura brônquica, estimulação cardíaca, dilatação ao nível dos vasos sanguíneos no músculo esquelético, estimulação da glicogenólise no fígado e de outros mecanismos calorigénicos, tais como a libertação de ácidos gordos livres. O isoproterenol induz também a libertação de insulina, a qual equilibra a hiperglicémia que se segue à glicogenólise. Os efeitos do isoproterenol ao nível do músculo liso variam com a densidade relativa dos receptores e de efeitos hormonais (Gilman, 1996; CPO, 1997).

A acção broncodilatadora deste fármaco deve-se ao seu efeito agonista sobre os receptores β (β_1 e β_2). A estimulação destes receptores activa a adenilciclase que converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclica (AMPc), o qual através da activação das cínases proteicas leva ao relaxamento do músculo liso (Figura 7). A estimulação dos receptores β_2 dos mastócitos faz com que diminua a libertação dos mediadores inflamatórios e broncoconstritores por estas células, revertendo a broncoconstrição e o edema. Este fármaco, bem como a efedrina, também presente no medicamento, que pertence ao mesmo grupo, aumenta a motilidade ciliar das células epiteliais da mucosa brônquica facilitando a remoção de muco, geralmente dificultada no asmático e no bronquítico crónico (Sarmiento, 1994; CPO, 1997).

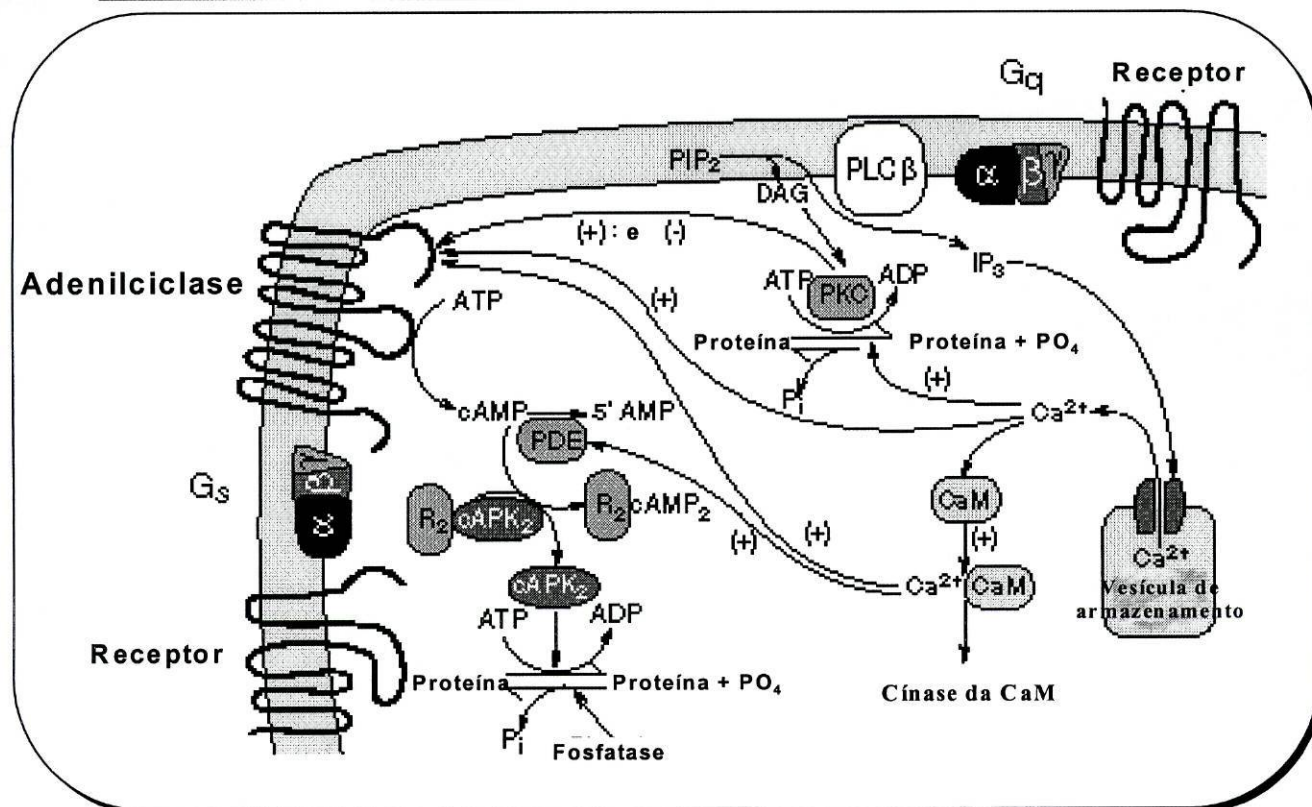


Figura 7. A formação de mensageiros secundários, AMPc e Ca²⁺, permite a activação dos processos que regulam a transmissão para o interior da célula, amplificando o sinal inicial e as oportunidades de regulação sinérgica ou antagonista, para outros processos de transmissão de sinais (PIP₂ – bifosfato de 4,5-fosfatidilinositol; DAG – diacilglicerol; IP₃ – trifosfato de 1,4,5-inositol; CaM – Calmodulina; R₂ – sub-unidades reguladoras da proteína cínase dependente do AMPc, que se ligam ao AMPc; cAPK₂ – sub-unidades catalíticas da proteína cínase dependente do AMPc; PCK – proteína cínase C, activada pelo Ca²⁺ e pelo DAG) (adaptada de Gilman, 1996).

A absorção do isoproterenol é rápida e completa por via oral, exercendo acção broncodilatadora rápida e intensa, embora relativamente pouco duradoura, o que sugere uma rápida inactivação no organismo. De facto, o isoproterenol em circulação é metabolizado pela enzima catecol-o-metiltransferase (COMT) e monoaminoxidase (MAO) no fígado e outros tecidos. Os metabolitos inactivos sofrem conjugação com sulfatos ou ácido glucorónico e são excretados pelos rins. Após a sua administração oral, a conjugação do isoproterenol ocorre em maior extensão o que se reflecte numa maior excreção de um conjugado do isoproterenol, que se pensa ser o sulfato (Wong, 1982). Apenas quantidades mínimas do composto são encontradas sem alteração química na urina.

O cloridrato de isoproterenol é recomendado para o tratamento da asma, na dose de 10 a 15 mg, três a quatro vezes ao dia, quando administrado pelas vias oral ou sublingual. Em tais doses pode, contudo, causar elevada incidência de efeitos secundários, nomeadamente taquicardia, elevações da pressão sistólica com queda da pressão diastólica, palpitações, perturbações gastrintestinais, sudação, tremores, vertigens, cefaleias e nervosismo.

Actualmente, para o tratamento da asma, o isoproterenol foi substituído por outros compostos simpaticomiméticos, como p.ex., o salbutamol (Gilman, 1996; Reynolds, 1996).

A terapia oral para a broncodilatação com agonistas adrenérgicos teve fraca aceitação desde a sua introdução no mercado, em grande parte devido aos riscos associados ao aparecimento de efeitos adversos, especialmente tremores, câimbras musculares, taquicardias e perturbações metabólicas. Existem apenas duas situações nas quais os agonistas β -adrenérgicos são usados: nas crianças com idade inferior a 5 anos, por não poderem manipular os inaladores em doentes com exacerbações graves de asma. Nestes últimos, qualquer aerossol, quer administrado como nebulizador, quer na forma de inalador com doseador ("metered dose inhaler"), poderá ser irritante e exacerbar tosse e o broncoespasmo. Nestas circunstâncias a terapia oral com β -agonistas poderá ser eficiente. No entanto, a frequência dos efeitos adversos sistémicos, com este tipo de terapia, é maior nos adultos que nas crianças (Gilman, 1996).

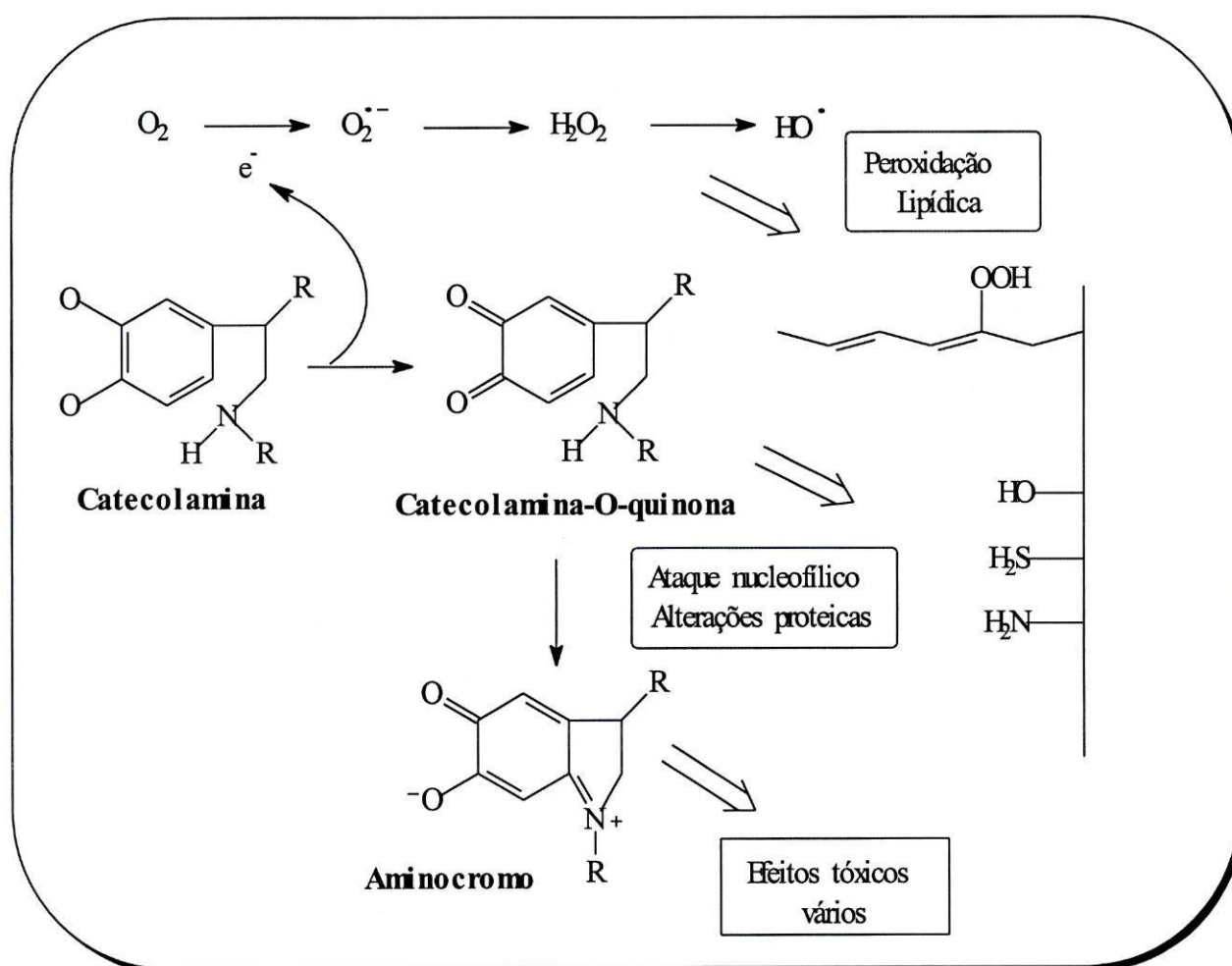
O isoproterenol insere-se no grupo das catecolaminas sintéticas, tal como o salbutamol e a fenilefrina, que foram desenvolvidas para o tratamento de anomalias cardíacas, brônquicas (asma) e nasais (congestão), respectivamente.

O isoproterenol, tal como foi referido acima, pertence ao grupo das catecolaminas. Neste grupo incluem-se as catecolaminas endógenas, nomeadamente a adrenalina, a noradrenalina (NA) e a dopamina e as catecolaminas sintéticas, como o isoproterenol, o salbutamol ou albuterol, a efedrina e a fenilefrina que foram desenvolvidas para o tratamento de anomalias brônquicas (asma), cardíacas e nasais (congestão), respectivamente. A presença de concentrações séricas elevadas de catecolaminas endógenas ou sintéticas pode, no entanto, exercer efeitos tóxicos diversos ao nível dos electrólitos, da estrutura bioquímica e membrana das células, podendo levar ao aparecimento de lesões e até de necrose hepática (vide Figura 8).

A presença de quantidades elevadas de catecolaminas endógenas ou sintéticas em hepatócitos isolados recentemente pode, no entanto, exercer efeitos adversos pela diminuição do número de receptores β -adrenérgicos na membrana plasmática dos hepatócitos (Martínez *et al.* 1993), levando à diminuição da sensibilidade para estes compostos.

Os processos oxidativos podem provocar toxicidade celular e originar lesões provocando doença (referido por Baez *et al.*, 1997). Os metabolitos tóxicos das catecolaminas – quinonas – podem ter um papel preponderante na produção de ROS com várias consequências patológicas, incluindo apoptose (Figura 8) (Sato *et al.*, 1995)

Figura 8 - Mecanismo de toxicidade resultante da oxidação das catecolaminas (adaptado de Dhalla *et al.*, 1996 por Remião, 1998b)



Reacções chave que promovem a formação de ROS, com um consequente efeito pró-oxidante, incluem a redução das quinonas pela captação de um electrão, catalizada por flavoproteínas, tais como a redutase do NADPH:citocromo P-450 e a reacção subsequente entre o radical semi-quinónico formado e dioxigénio originando o radical superóxido (referido por Baez, 1997). A redução acompanhada por auto-oxidação e ciclo "redox" na presença de dioxigénio, contribui de forma significativa para a toxicidade característica das quinonas, levando consequentemente ao stress oxidativo e/ou à sua interacção com nucleófilos celulares, tais como sulfidrilos proteicos e não proteicos (Monks *et al.*, 1992).

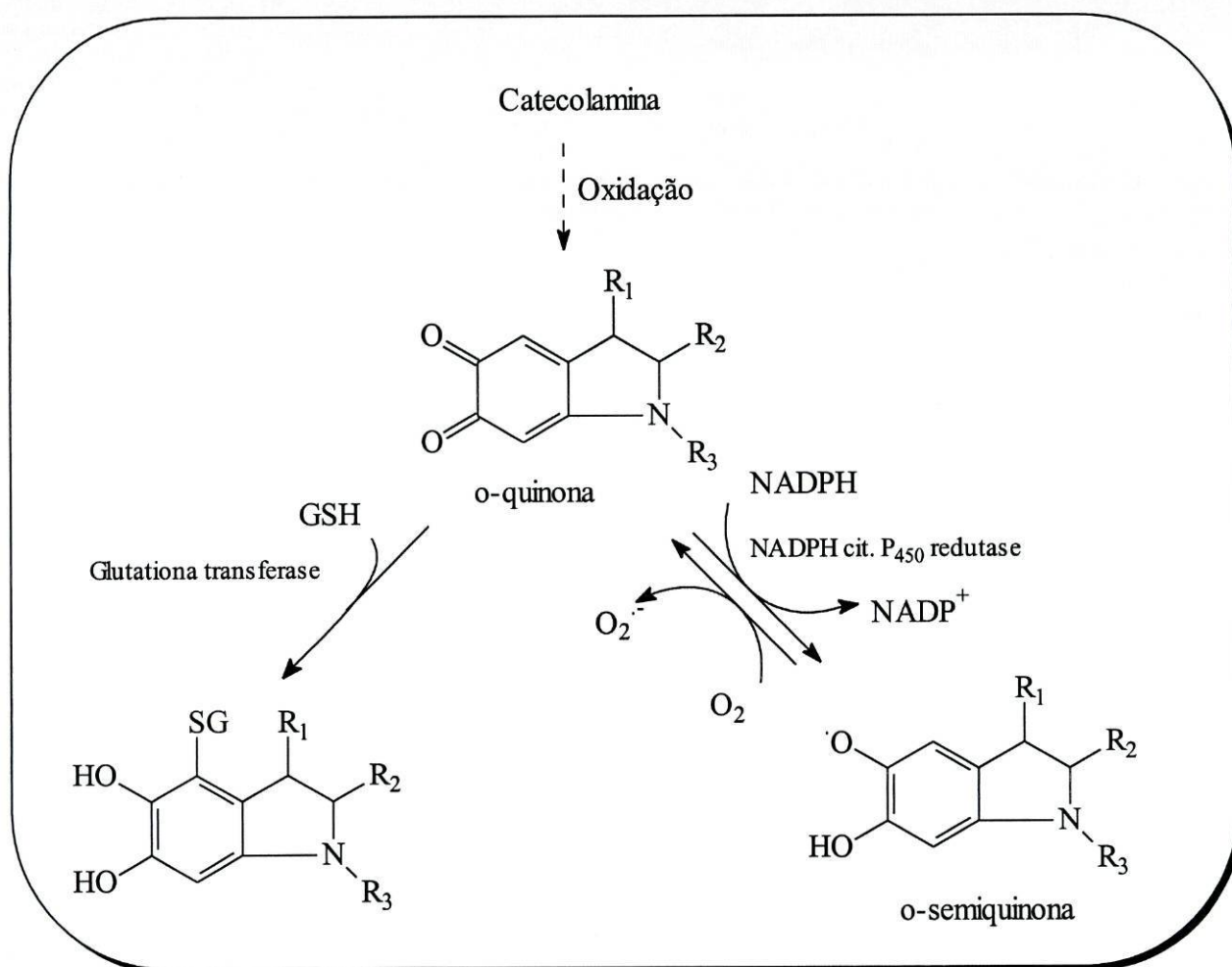


Figura 9. Percurso possível para o metabolismo pró-oxidante ou antioxidante de o-quinonas derivado das catecolaminas (adaptado de Baez *et al.*, 1997)

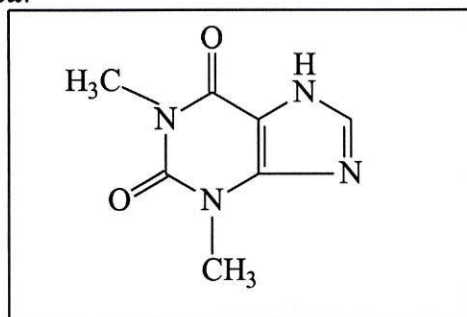
O processo pró-oxidante, que resulta em processos degenerativos nos sistemas celulares que contêm catecolaminas, é uma consequência da formação de ROS derivadas da redução o-quinonas (p.ex., aminocromos) a o-semiquinonas. Estas são re-oxidadas na presença de dioxigénio, dando origem a um ciclo "redox", através do qual quantidades

muito pequenas de catecol o-quinonas podem gerar grandes quantidades de ROS. Um importante e potente mecanismo antioxidante é a conjugação redutiva das o-quinonas, por forma a dar um conjugado da GSH, uma vez que este conjugado é resistente à oxidação pelo dióxigénio, radicais superóxido e peróxido de hidrogénio. Este processo antioxidante pode desempenhar um papel hepatoprotector na prevenção da formação de ROS dependentes das catecolaminas (Baez *et al.*, 1997). Existem, no entanto, alguns conjugados de GSH com electrófilos que, em vez de serem um veículo para diminuir a toxicidade do composto, formam um conjugado ainda mais reactivo que o electrófilo (Monks e Lau, 1992; Dekant e Vamvakas, 1993; Monks e Lau, 1997). A toxicidade associada às catecolaminas foi determinante na escolha do Prelus e do isoproterenol, isoladamente ou em associação, para os nossos ensaios.

4.1.2. Teofilina

Denominação química: 1,3-dimetil-3,7-di-hidro-1H-purina-2,6-diona.

Estrutura química:



Outros sinónimos: 1,3- dimetilxantina

Descrição: Pó cristalino, branco, ou quase branco.

Fórmula molecular: C₇H₈N₄O₂

Massa relativa: 180,2

Solubilidade: Pouco solúvel na água (1 g em 120 ml de água) e ligeiramente solúvel no etanol (1 g em 80 ml de etanol), muito pouco solúvel no éter e no clorofórmio (1 g em 200

ml de clorofórmio). A teofilina dissolve-se nas soluções dos hidróxidos dos metais alcalinos, na amónia e nos ácidos minerais.

(Moffat, 1986; Budavary *et al.*, 1989; Reynolds, 1996; FP VI, 1997)

A teofilina é uma metilxantina e partilha com a cafeína e a teobromina certo número de acções farmacológicas de interesse terapêutico. Promovem o relaxamento do músculo liso, estimula o Sistema Nervoso Central (SNC), estimula o músculo cardíaco e actua nos rins como diurético (Gilman, 1996).

Em termos terapêuticos a teofilina é usada para aliviar a apneia neonatal e para controlar manifestações asmáticas e aliviar os espasmos brônquicos (Stravic, 1988; Minton e Henry, 1996). O seu efeito terapêutico, no tratamento da asma deve-se em grande parte ao seu efeito relaxante do músculo liso brônquico. Adicionalmente, pode haver outras acções, como, p.ex., a inibição da libertação de mediadores pelos mastócitos, a melhoria da contractilidade diafragmática e a estimulação dos centros respiratórios medulares. Desta última acção poderá resultar um aumento da sensibilidade desses centros aos efeitos estimuladores do dióxido de carbono (CO₂) (Sarmiento, 1994).

Os mecanismos de acção propostos para os efeitos farmacológicos e fisiológicos induzidos pelas metilxantinas, onde se inclui a teofilina, incluem: 1) inibição das fosfodiesterases, aumentando o AMPc intracelular, 2) efeitos directos na concentração do cálcio intracelular, 3) efeitos indirectos nas concentrações do cálcio intracelular por uma hiperpolarização da membrana celular, 4) o desacoplamento do cálcio intracelular aumenta com os elementos contrácteis dos músculos, 5) antagonismo dos receptores de adenosina (Gilman, 1996).

A sua capacidade broncodilatadora é maior do que a de outras metilxantinas verificando-se, com o seu uso, um nítido aumento da capacidade vital. É, por conseguinte, um fármaco de considerável valor terapêutico no tratamento da asma brônquica (Sarmiento, 1994). Um conhecimento mais profundo da farmacocinética da teofilina e a possibilidade de monitorização dos seus níveis plasmáticos proporcionou um maior interesse pela teofilina como broncodilatador, essencialmente para controlar sintomas de asma nocturna em doentes com asma crónica, sob a forma de preparações de libertação prolongada (Upton, 1991).

A terapia inicia-se usualmente pela administração de 12 a 16 mg/Kg/dia de teofilina, até ao máximo de 400 mg/dia durante pelo menos três dias (referido por Gilman, 1996). A dose recomendada para crianças é inferior e tem que ser ajustada de forma a diminuir ao mínimo os efeitos secundários provocados pela teofilina, como vômitos, náuseas, nervoso e insónia (Stravic, 1988; Gilman, 1996). A concentração plasmática da teofilina deve ser monitorizada por forma a permitir um ajuste da dose.

A teofilina é facilmente absorvida por via oral. Distribui-se por todo os compartimentos do organismo, atravessa a placenta e passa para o leite materno. Em concentrações terapêuticas a teofilina liga-se fortemente às proteínas plasmáticas, cerca de 60%, diminuindo este valor para 40 % em recém-nascidos e nos doentes adultos com cirrose hepática.

A teofilina é parcialmente desmetilada no fígado originando: 1-metilxantina que, por sua vez, é convertida a ácido 1-metilúrico por acção da xantina oxidase antes de ser excretada, e a 3-metilxantina que se acumula no plasma e é eliminada sob esta forma. A principal via metabólica da teofilina envolve a sua 8-hidroxilação resultando na formação de ácido 1,3-dimetilúrico, forma sob a qual é excretada em maior extensão. Cerca de 15% da teofilina é eliminada pela urina sem qualquer alteração metabólica (vide Figura 10) (O'Donnel, 1994a; Gilman, 1996; Minton e Henry, 1996).

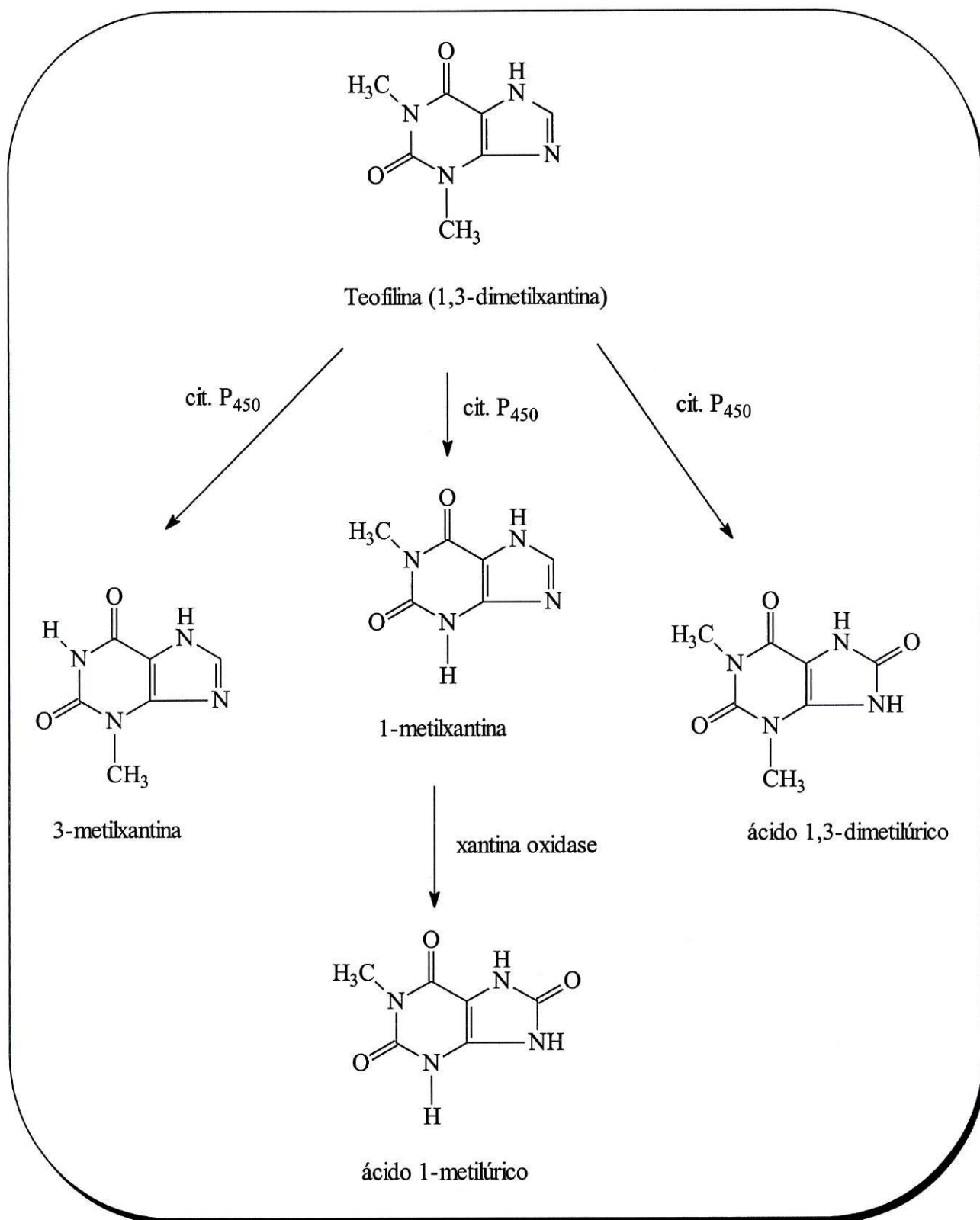


Figura 10. Principais vias metabólicas da teofilina.(adaptado de Minton e Henry, 1996)

O tempo de semi-vida da teofilina varia entre 20 e 36 horas no adulto. Existe uma grande variabilidade inter-individual na velocidade de eliminação da teofilina, associada quer a factores genéticos, quer a factores ambientais. Variações relacionadas com interacções com outros fármacos (p. ex., fenobarbital, contraceptivos orais, etanol), ou com determinados processos patológicos (p. ex., cirrose hepática, constipação, infecções virais, doença cardíaca) podem originar grandes variações na “clearance” da teofilina. Mesmo em indivíduos saudáveis num ambiente controlado têm sido descritas variações inter-individuais significativas na “clearance”, no metabolismo e na eliminação da teofilina (referido por Stravic, 1988; Upton, 1991; O’Donnel, 1994b; Minton e Henry, 1996).

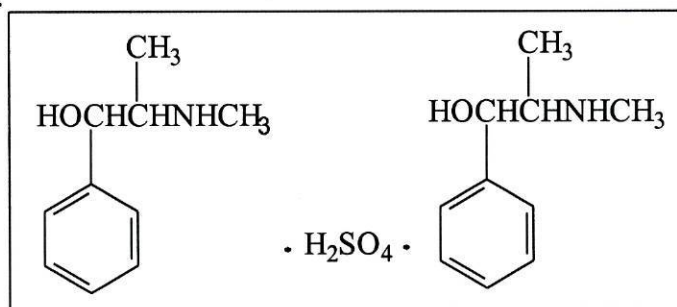
Os efeitos tóxicos das xantinas, habitualmente resultantes da sua acção estimulante do sistema nervoso central, nas doses terapêuticas são relativamente raros, quando administrado oralmente (Stravic, 1988; Minton e Henry, 1996).

A teofilina pode ser considerada relativamente segura no tratamento e profilaxia de vários tipos de broncoespasmo, nomeadamente em doentes que têm dificuldade em utilizar nebulizadores das aminas simpaticomiméticas, em casos de asma nocturna e, em associação com outros antiasmáticos, nas situações refractárias à monoterapia. No entanto, verifica-se que há actualmente a tendência para uma diminuição da sua utilização em detrimento das aminas simpaticomiméticas e do brometo de ipratrópio (Gilman, 1996).

4.1.3. Sulfato de efedrina

Denominação química: Sulfato de (1R,2S)-2-metilamino-1-fenil-1-propanol

Estrutura química:



Descrição: Pó cristalino ou cristais finos de cor branca. Escurecem à luz.

Fórmula molecular: $(C_{10}H_{15}NO)_2 \cdot H_2SO_4$

Massa relativa: 428,5

Solubilidade: Solúvel em água (1g em 1,3ml de água) e pouco solúvel no etanol (1g em 90 ml de etanol).

(Moffat, 1986; Budavary *et al.*, 1989; Reynolds, 1996; FP VI, 1997)

A efedrina é um composto simpaticomimético, obtido da planta do género *Ephedrus* e é usada há mais de 5000 anos na medicina chinesa (Gilman, 1996). Tem sido utilizada na medicina ocidental como estimulante do SNC nos casos de depressão, narcolepsia e para o tratamento da enurese e “myastenia gravis”, no entanto, são usos pouco comuns. A efedrina foi extensamente comercializada sob a forma de medicamentos não sujeitos a prescrição obrigatória, essencialmente no EUA, como broncodilatador. Actualmente todos estes estados de doença são tratados com fármacos mais eficientes (CPO, 1997).

Em 1996, nos EUA, saiu uma lei que obrigava a um registo obrigatório das vendas de grandes quantidades de efedrina. Isto deveu-se a uma tentativa para controlar o uso deste composto como substrato para a síntese ilegal de anfetamina e metanfetamina. Esta medida levou a que, em 1997, a FDA obrigasse à remoção da efedrina de todos os medicamentos comercializados que não necessitassem de prescrição médica obrigatória, baseada no seu uso ilegal para a produção de anfetaminas, metanfetaminas e outras drogas de desenho igualmente estimulantes (“design drugs”) (CPO, 1997).

A efedrina provoca a libertação da NA endógena dos seus locais de armazenamento, o que representa o seu efeito indirecto simpaticomimético (Sarmiento, 1994). Por sua vez, a NA estimula os receptores α e β . A efedrina pode também estimular directamente os receptores β , particularmente ao nível da musculatura lisa brônquica. Os seus efeitos β adrenérgicos resultam da produção de AMP cíclico pela activação da adenilciclase. Os efeitos α -adrenérgicos são o resultado da inibição da adenilciclase (Gilman, 1996).

Tal como para os outros compostos simpaticomiméticos, os efeitos fisiológicos da efedrina são muito variáveis e muitas vezes dependem da dose administrada (Gilman, 1996).

A efedrina relaxa a musculatura lisa brônquica através da estimulação dos receptores β_2 , aliviando o broncoespasmo, melhorando as trocas de ar, aumentando a

capacidade vital. Quando são administradas doses baixas de efedrina, isoladamente, há uma estimulação dos receptores β_1 do coração, resultando um efeito inotrópico positivo, que inicialmente será responsável pelo efeito pressor do fármaco. Apesar de a efedrina exercer um efeito cronotrópico positivo no nodo sinoauricular, este efeito pode ser invertido por uma resposta compensatória vagal ao aumento da pressão sanguínea. Consequentemente, poderá originar bradicardia ou taquicardia ao nível do nodo sinoauricular. Alguns doentes não apresentam qualquer tipo de alteração do ritmo cardíaco. As arritmias podem surgir em casos de administração de doses elevadas. De um modo geral, a efedrina aumenta o fluxo sanguíneo coronário. A nível periférico, a efedrina pode provocar vasoconstrição como resultado de estimulação dos receptores α_1 . Há igualmente vasoconstrição das arteríolas da pele, das mucosas e das vísceras, após administração da efedrina, enquanto a vasodilatação ocorre ao nível do músculo esquelético. Pode ocorrer uma constrição ou dilatação dos vasos pulmonares ou cerebrais. A efedrina aumenta a pressão sanguínea sistólica e diastólica. A sua acção pressora tem um efeito mais prolongado que a adrenalina e a NA. Pode também ocorrer um efeito "rebound". A efedrina tem um efeito estimulante sobre o SNC, mas menos pronunciado que o efeito provocado pelas anfetaminas. Geralmente, promove o relaxamento da musculatura lisa no tracto gastrointestinal, mas contrai o esfíncter da bexiga, podendo provocar retenção urinária. Este fármaco aumenta a glicogenólise e parece não ter qualquer efeito na hiperglicémia. Um aumento no consumo de oxigénio e na velocidade metabólica podem ocorrer como resultado da estimulação central (CPO, 1997).

A efedrina é rápida e completamente absorvida após administração oral e a broncodilatação surge ao fim de 15 a 60 minutos, mantendo-se por 2 a 4 horas. Uma pequena parte da efedrina é metabolizada no fígado via desaminação oxidativa, N-desmetilação, hidroxilação aromática, seguida de conjugação (Figura 11). Metabolitos já identificados são a p-hidroxiefedrina, a p-hidroxinoradrenalina, a NA e conjugados destes metabolitos com o glucoronato. A excreção é feita através da urina, sendo a maior percentagem correspondente à efedrina inalterada (no homem cerca de 53 a 74%) (Feller, 1977; Sever, 1975). O tempo de semi-vida da efedrina é de 3 horas a pH 5 e de cerca de 6 horas a um pH urinário de 6, uma vez que a eliminação deste composto e dos seus metabolitos é aumentada com a diminuição do pH (Gilman, 1996).

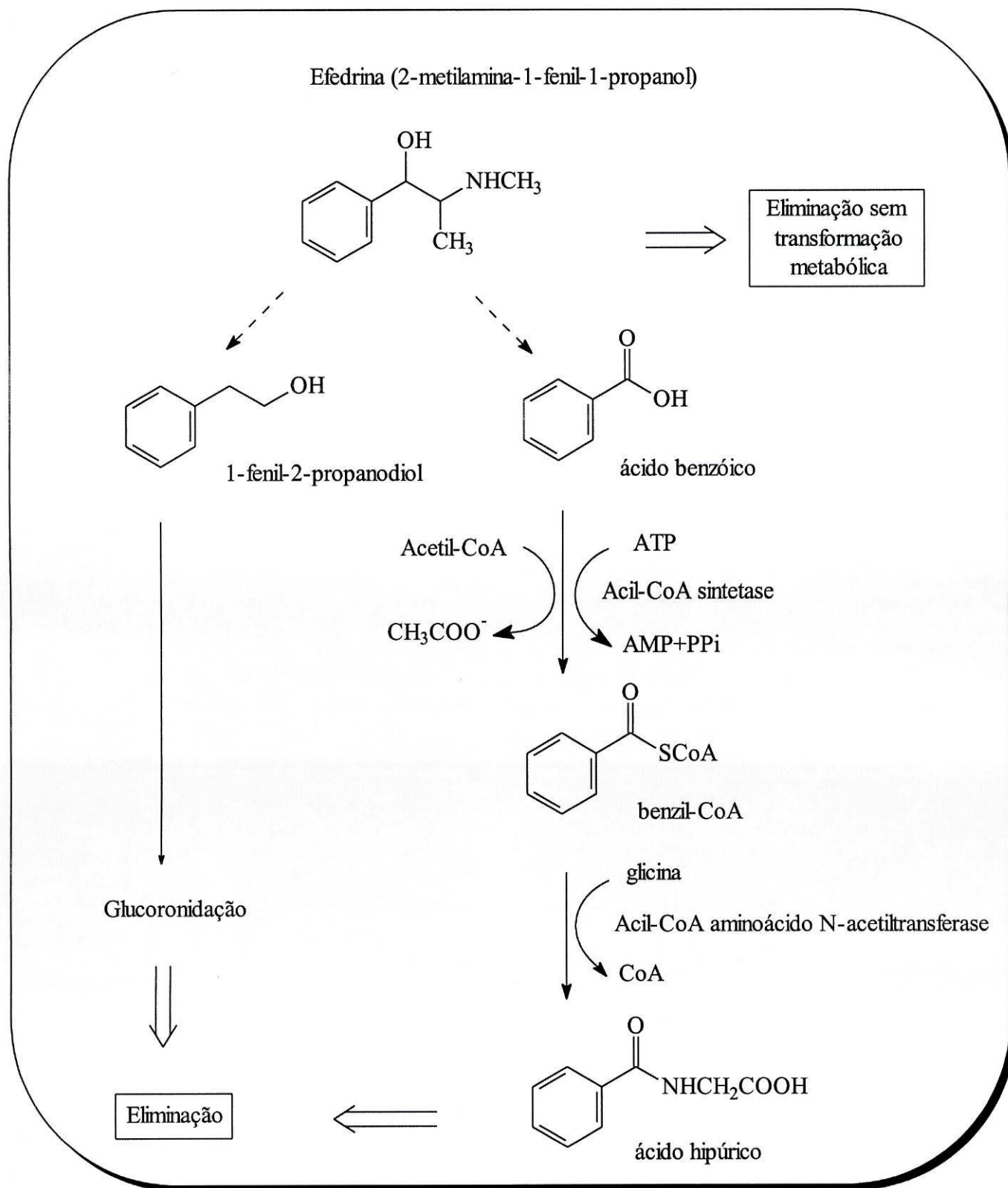


Figura 11. Principais vias metabólicas da efedrina.

Embora possa causar efeitos tóxicos, não há casos descritos, segundo o nosso conhecimento, de intoxicações fatais no homem resultantes da administração de efedrina. A maioria dos efeitos secundários da efedrina são devidos à sua acção estimulante sobre o sistema nervoso central como sejam náuseas, vômitos, sudação, vertigens, tremor, nervosismo, ansiedade e insónia. Outros efeitos como a retenção urinária e as palpitações são provavelmente resultantes de acção adrenérgica periférica. Não há descritos, segundo o nosso conhecimento, efeitos tóxicos crónicos resultantes da administração de efedrina, nem existem evidências de que determine habituação (Tinkelman, 1975). Em certos casos pode surgir taquifilaxia, fenómeno controlável por uma frequência reduzida de administração.

As reacções secundárias ao nível do SNC que podem surgir após a administração de efedrina são bastante sérias. Normalmente, os doentes podem sentir nervosismo, ansiedade, agitação, fraqueza, irritabilidade e insónia. Estes sintomas são ainda mais graves com o aumento das doses, podendo levar a estados de psicose, euforia, delírio e confusão. Ao nível cardíaco os efeitos secundários podem manifestar-se após estimulação do miocárdio, afectando o ritmo cardíaco, podendo também surgir taquicardias ao nível do nodo sinoauricular e palpitações. Efeitos secundários de etiologia mista podem surgir durante a terapia com efedrina como dores de cabeça, dificuldade respiratória, febre, anorexia, náuseas e vômitos (CPO, 1997).

4.1.4. Iodeto de potássio

Descrição: Pó ou granulado branco, ou cristais incolores, higroscópicos. Escurece com a luz.

Fórmula molecular: KI

Massa relativa: 166,0

Solubilidade: Muito solúvel na água (1 g em 0,7 ml) e facilmente solúvel na glicerina (1 g em 2 ml de glicerina) e solúvel no etanol (1 g em 22 ml de etanol).

Ponto de fusão: 680°C (volatiliza a temperaturas superiores).

(Moffat, 1986; Budavary *et al.*, 1989; Reynolds, 1996; FP VI, 1997)

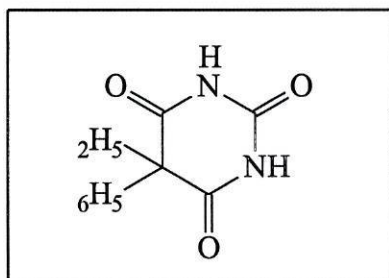
O iodeto de potássio é um expectorante salino. Os expectorantes são fármacos que aumentam a produção e diminuem a viscosidade das secreções. Conclui-se, portanto, que só actuam quando a causa da tosse é a acumulação de secreções espessas no tracto respiratório ou quando a sua causa é a “secura” da mucosa, o que leva à sua fácil irritação. Os expectorantes, ao diminuírem a viscosidade das secreções brônquicas e ao aumentarem a película mucosa nos brônquios, actuam como antitússicos.

O mecanismo de acção do iodeto de potássio acenta numa acção reflexa pois actua irritando a mucosa gástrica e levando, por via vago-vagal, a um aumento da secreção mucosa brônquica. Este mecanismo de acção leva a que alguns autores discordem da sua utilização pois, tratando-se de irritantes gástricos, poderão ocasionar vômitos, anorexia, dor epigástrica, estando, assim, contra-indicados em doentes com passado ulceroso. Os iodetos têm, além da sua acção reflexa, uma acção estimulante directa das glândulas brônquicas, pois parte da sua excreção é feita por via respiratória. O seu uso é limitado, pelo seu gosto metálico e pelos seus efeitos laterais, que incluem, além da irritação gástrica, rinorreia, eritema e aumento do volume das glândulas salivares que se tornam dolorosas, para além do risco de iodismo (Bernecker, 1969).

4.1.5. Fenobarbital

Denominação química: 5-etil-5-fenil-1H,3H,5H-pirimidina -2,4,6-triona.

Estrutura química:



Outros sinónimos: ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico; ácido feniletilbarbitúrico, fenobarbitona, feniletilmalonilureia.

Descrição: Pó cristalino branco ou cristais incolores, inodoros e de sabor amargo.

Fórmula molecular: $C_{12}H_{12}N_2O_3$

Massa relativa: 232,2

Solubilidade: Muito pouco solúvel em água (1 g em 1000 ml de água), facilmente solúvel no etanol (1 g em 10 ml) e solúvel no éter e no clorofórmio (1 g em 40 ml de éter ou de clorofórmio). O fenobarbital dá compostos solúveis na água com os hidróxidos e carbonatos dos metais alcalinos e com a amónia.

Ponto de ebulição: 174-178°C

Constante de dissociação: pK_1 7,3 pK_2 11,8

(Moffat, 1986; Budavary *et al.*, 1989; Reynolds, 1996; FP VI, 1997)

Se por um lado os doentes com asma brônquica necessitam de uma sedação que evite o papel desencadeante ou agravante dos acessos de asma, resultantes da ansiedade, o uso de sedativo está particularmente indicado quando se empregam aminas simpaticomiméticas com a finalidade broncodilatadora, visto que os sedativos exercem um certo grau de antagonismo perante possíveis manifestações adversas da medicação adrenérgica.

O fenobarbital é um barbitúrico com propriedades anticonvulsivantes e sedativo-hipnóticas. As suas propriedades sedativo-hipnóticas derivam do seu efeito ao nível da formação “polysynaptic midbrain reticular”, que controla a estimulação do SNC. O fenobarbital tem também uma acção antidepressiva não selectiva no SNC, com um efeito lento mas com um tempo de acção prolongado.

Quando administrado por via oral cerca de 70 a 90% é absorvido no intestino, sendo a absorção retardada pela presença de alimentos. O fenobarbital é o barbitúrico comercializado com maior tempo de acção. O pico sérico, por via oral, é atingido ao fim de 2-18 horas. O efeito sedativo permanece por várias horas, mas outros efeitos ao nível do SNC poderão permanecer por vários dias (CPO, 1997).

O fenobarbital distribui-se por todo o organismo, tecidos e fluídos, incluindo o tecido adiposo e o fluído cerebrospinal e tem a capacidade de atravessar a placenta. Cerca de 20 a 45% do composto liga-se às proteínas plasmáticas. A actividade sedativa manifesta-se para concentrações plasmáticas da ordem dos 10 µg/ml. Concentrações plasmáticas em excesso superiores a 50 µg/ml pode levar ao estado de coma (CPO, 1997).

O fenobarbital é metabolizado no fígado principalmente por 4-hidroxilação a um metabolito inactivo (4-hidroxifenobarbital) (Figura 12). Cerca de 25% do composto é eliminado pela urina sem qualquer alteração, enquanto os restantes 75% são excretados sob a forma de conjugados p-hidroxilados com o glucoronato ou sulfato (Gilman, 1996).

O tempo de semi-vida do fenobarbital nos adultos ronda as 50 a 120 horas e nas crianças as 37-73 horas. A eliminação metabólica dos barbitúricos, onde se inclui o fenobarbital, é mais rápida nos jovens do que nos recém-nascidos e idosos e o seu tempo de semi-vida encontra-se igualmente elevado durante a gravidez. Doenças crónicas hepáticas, especialmente cirrose, aumentam o tempo de semi-vida do fenobarbital. A administração repetida deste fármaco diminui de forma significativa a sua biotransformação, devido ao facto de ele ser um indutor do sistema microsomal enzimático, que é responsável pela sua biotransformação hepática (Gilman, 1996).

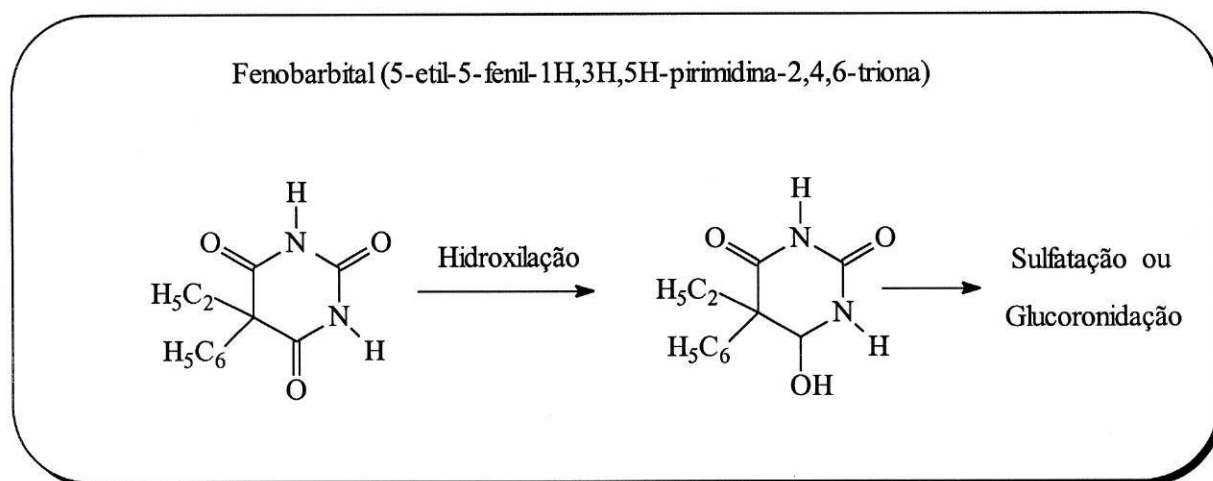


Figura 12. Principal via metabólica do fenobarbital.

Algumas das contra-indicações deste fármaco, sucintamente, são o facto de não dever ser administrado em crianças, em casos de depressão conhecida dos doentes, nos idosos, durante a gravidez, na fase de amamentação, nos casos de hipotensão, nos casos em que o doente sofre de perturbações do seu estado de saúde mental, doença pulmonar, insuficiência renal, insuficiência hepática, porfíria, infecção respiratória e nos toxicodependentes (CPO, 1997).

Este composto quando associado com depressores do SNC provoca uma depressão severa, sendo o etanol e os anti-histamínicos dois exemplos destes compostos. O fenobarbital inibe de forma competitiva o metabolismo de certos xenobióticos. No entanto,

a grande maioria das suas interações com outros compostos resulta da indução das enzimas microssomais hepáticas. Este composto é mesmo considerado um “cabeça de lista” no conjunto dos fármacos indutores do sistema microssomal hepático, sendo por vezes utilizado em estudos *in vitro* por ter esta característica, como p.ex., quando se pretende saber se um dado xenobiótico é metabolizado por este sistema, podemos induzir as enzimas com o fenobarbital e estudar se existem alterações nos parâmetros escolhidos para estudar a toxicidade desse xenobiótico (Carvalho *et al.*, 1993)

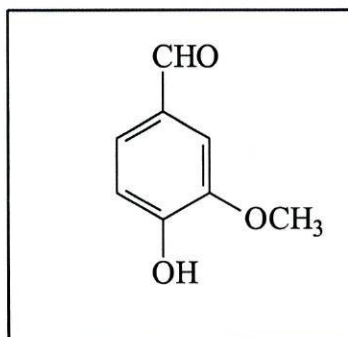
A indução das enzimas hepáticas aumenta o metabolismo de hormonas endógenas, o que pode provocar distúrbios endócrinos, bem como o dos contraceptivos orais, diminuindo as suas propriedades anticoncepcionais. O fenobarbital acelera a "clearance" de outros xenobióticos que sejam metabolizados pelo sistema enzimático microssomal.

São vários os efeitos secundários associados ao fenobarbital, dos quais se refere alguns que poderão surgir como, diarreia, obstipação, hipotensão, impotência, insónia, rash cutâneo maculopapular, fotossensibilidade, púrpura, nefrite intersticial, dificuldades de aprendizagem, diminuição da libido, miose, midríase, náuseas, vômitos, pesadelos nocturnos e urticária.

4.1.6. Vanilina

Denominação química: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído.

Estrutura química:



Outros sinónimos: Aldeído vanílico.

Descrição: Pó ou granulado cristalino branco ou amarelado.

Fórmula molecular: C₈H₈O₃

Massa relativa: 152,1

Solubilidade: Solúvel em água (1 g em 100 ml de água), solúvel no etanol, no éter e no clorofórmio

Ponto de fusão: 81-83°C

Constante de dissociação: pK_a 7,4

(Moffat, 1986; Budavary *et al.*, 1989; Reynolds, 1996)

A vanilina é um dos aromatizantes alimentares mais importantes, sendo também largamente utilizado em cosméticos e medicamentos (Anklam *et al.*, 1997). Um exemplo desta aplicação é precisamente o medicamento em estudo nesta dissertação – “Prelus elixir composto”.

A vanilina é metabolizada originando um ácido e um álcool, em ratos (Figura 13). A maior parte dos seus metabolitos é excretada ao fim de 24 horas, essencialmente sob a forma de conjugado com o sulfato ou glucoronato, embora a forma ácida seja também excretada livre ou conjugada com a glicina (Strand and Scheline, 1975). A vanilina é, igualmente um bom substrato para conjugação com o sulfato, em fígado de ratos e no homem (Cruickshank *et al.*, 1993; Bamforth *et al.*, 1993).

Alguns autores atribuem à vanilina uma acção antioxidante (Aruoma *et al.*, 1990; Laughton *et al.*, 1991). No entanto, também existe a possibilidade de, em certas condições experimentais, se poder comportar como um pró-oxidante (Liu and Mori, 1993). Outro aspecto, que nos levou a suspeitar da possível toxicidade da vanilina é o facto de ela apresentar características indutoras da citotoxicidade induzida por certos compostos químicos de aberrações cromossómicas e mutagénicas, em ensaios *in vitro*, com bactérias, conforme referido por Tamai, em 1992. Foram estes aspectos associados ao facto de a vanilina ser um produto da oxidação do eugenol, que é um composto com uma toxicidade já referida por alguns investigadores (Thompson *et al.*, 1989; Mizutani *et al.*, 1991a; Mizutani *et al.*, 1991b; Bolton *et al.*, 1995; Gerosa *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1998; Bodell *et al.*, 1998) que fizeram com que este composto fosse escolhido para um dos nossos ensaios.

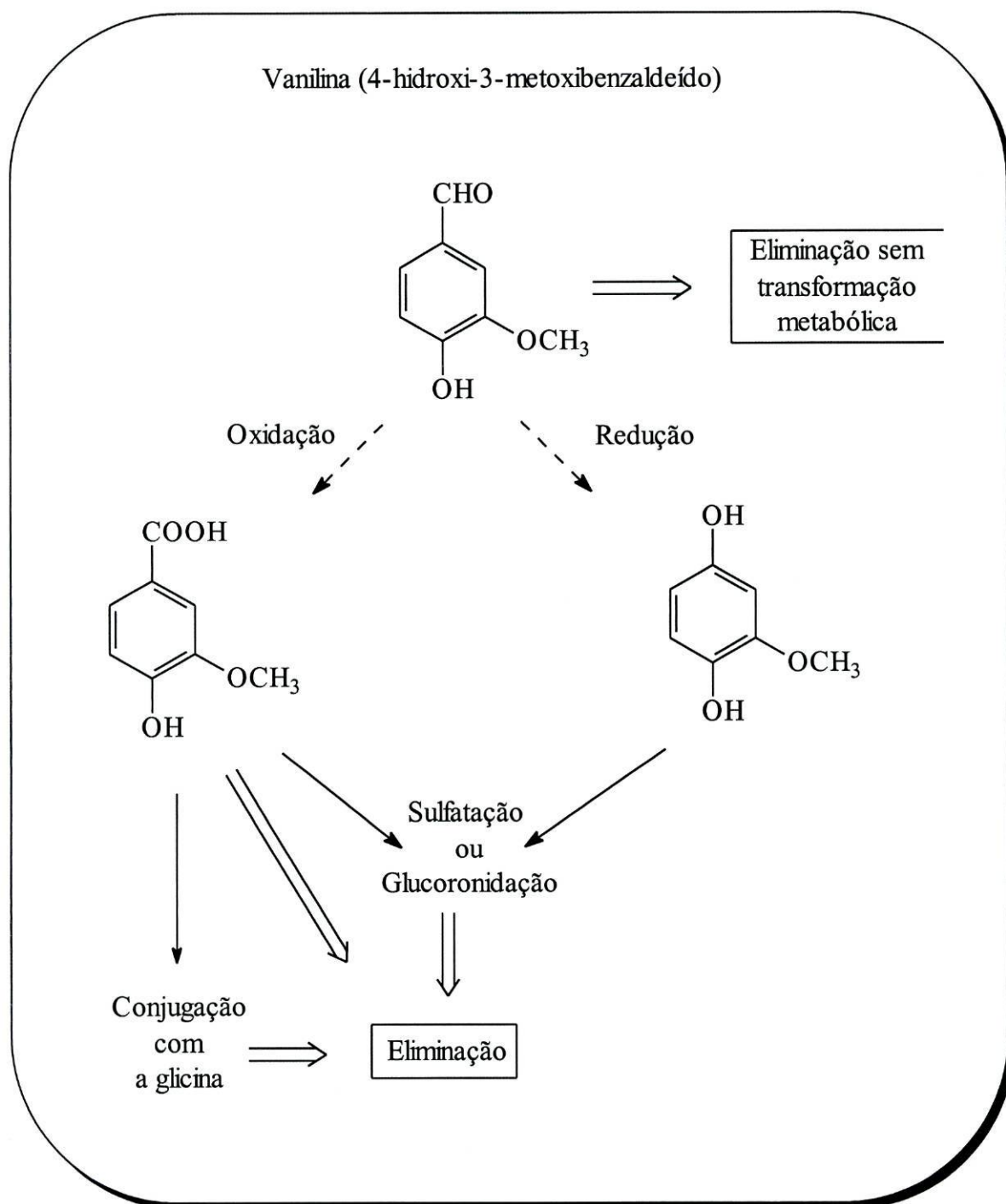


Figura 13. Principais vias metabólicas da vanilina.

4.1.7. Etanol

Outros sinónimos: álcool, álcool etílico.

Descrição: Líquido transparente, volátil, muito inflamável e higroscópico.

Fórmula molecular: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Massa relativa: 46,07

Solubilidade: Miscível com a água, éter e clorofórmio.

(Moffat, 1986; Budavary *et al.*, 1989; Reynolds, 1996; FP VI, 1997)

O Etanol é utilizado nesta formulação medicamentosa como um veículo, sendo o responsável pela designação “elixir”, conferida a este medicamento. O etanol é um excelente solvente, sendo muitas vezes usado com este mesmo objectivo em preparações medicamentosas.

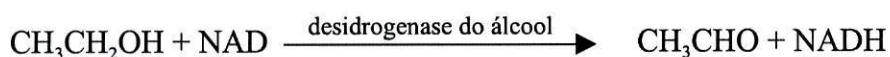
Neste subcapítulo não são referidas as acções do etanol sobre o SNC, sobre o sistema cardiovascular, na dependência física que provoca e sobre o síndrome alcoólico fetal por acharmos que estas acções estão desenquadradas do tema desta dissertação (Snyder and Andrews, 1996).

Tem sido descrito por vários investigadores que os efeitos tóxicos do etanol são, na sua maior extensão, provocados pelos seus metabolitos (Belinsky *et al.*, 1984; Dianzani, 1985; referido por Cobreros *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 1998). Os mecanismos responsáveis pelos danos provocados pelo etanol a nível hepático estão ainda por esclarecer na sua totalidade mas, no entanto, as atenções têm sido focalizadas, para os produtos da oxidação do etanol e para o papel das espécies reactivas de oxigénio ao nível hepático (Trenti *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 1998). Fígado gordo, cirrose, esteatose, degeneração hepática e cancro são os efeitos finais mais graves para o homem resultantes da hepatotoxicidade do etanol.

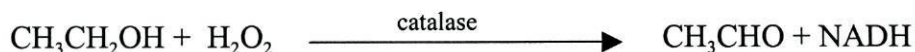
O etanol, quando administrado por via oral, é rapidamente absorvido pelo tracto GI, sendo essa absorção alterada pela presença de alimentos no estômago. Após a absorção o etanol é distribuído pelos tecidos e fluídos do organismo. O pico sérico é atingido 30 a 90 minutos após a sua ingestão (Gilman, 1996; CPO, 1997).

O metabolismo do etanol segue uma cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade a que se processa o seu metabolismo é relativamente constante, de acordo com a sua concentração no sangue. Em média um homem adulto tem a capacidade de metabolizar cerca de 10 a 20 ml/hora ou 120mg/Kg/hora. Este metabolismo é afectado por vários factores como a idade, história de um consumo abusivo de álcool e por alterações da função hepática (Gilman, 1996).

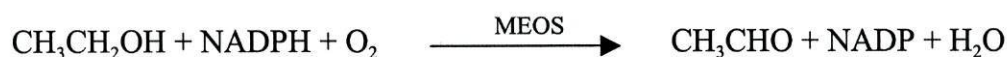
A desidrogenase do álcool (E.C. 1.1.1.1) é uma enzima solúvel que se encontra em elevada concentração no fígado (Dianzani, 1985; Snyder and Andrews, 1996). Tem um papel fundamental no metabolismo do etanol. A coenzima da reacção é a nicotinamina-adenina dinucleótido (NAD) e os produtos são o acetaldeído e a nicotinamina-adenina dinucleótido na forma reduzida (NADH):



Uma segunda enzima capaz de transformar o etanol em acetaldeído é a catalase que, pela sua actividade peroxidativa, usa o H_2O_2 para fazer a oxidação, o que se verifica essencialmente nas situações em que as concentrações de etanol sanguíneas são significativamente elevadas (referido por Snyder and Andrews, 1996):



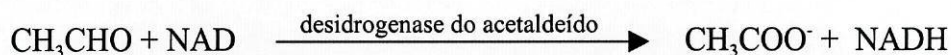
A terceira enzima com capacidade para transformar o etanol, foi denominada inicialmente por “microsomal ethanol oxidizing system” (MEOS) e está localizada no retículo endoplasmático liso:



Actualmente, pela nomenclatura oficial, esta enzima é designada por citocromo P450 2E1 (CYP2E1), enzima esta que é induzida por vários outros compostos (como p.exs., paracetamol, clorofórmio, tetracloreto de carbono, dimetilnitrosamina, aflatoxina B1 e clorpromazina).

Por sua vez, o acetaldeído formado é metabolizado pela desidrogenase do acetaldeído, enzima dependente da NAD que, no fígado de rato tem uma localização

mitocondrial, enquanto no fígado humano tem uma localização citoplasmática (referido por Snyder and Andrews, 1996):



O acetato resultante desta reacção é libertado do fígado e oxidado periféricamente, provavelmente porque durante a oxidação do etanol há um aumento na razão NADH/NAD, que, por sua vez, leva a uma diminuição do oxaloacetato disponível, a uma diminuição da actividade da desidrogenase do piruvato e à inibição da sintetase do citrato, factores estes que em conjunto inibem a oxidação do acetato no fígado. Quando este metabolito não é eliminado ou metabolizado, surgem danos hepáticos graves (Dianzani, 1985).

A eliminação de uma pequena porção do etanol sem qualquer alteração é feita através da urina, sendo uma parte eliminada do organismo por exalação ou através da pele (Snyder and Andrews, 1996).

Parte Experimental e Resultados

5. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DA CITOTOXICIDADE HEPÁTICA DE XENOBIÓTICOS

5.1. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO

5.1.1. Materiais utilizados

A Colagenase tipo I, o ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico (Hepes), o ácido etilenoglicol-bis (β -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetracético (EGTA), a albumina bovina sérica (fracção V), o ácido 2-tiobarbitúrico, a redutase da glutathione (EC 1.6.4.2.), a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotido (NADH), o azul de tripano, o ácido pirúvico e a glutathione reduzida (GSH) foram adquiridos à SIGMA Chemical Company (St. Louis, Mo., USA).

O ácido perclórico, o ácido cloroacético e o metanol foram adquiridos à MERCK (Darmstadt, Germany)

Os solventes usados em HPLC tinham grau de pureza "Lichrosolv" e eram da marca MERCK. A água usada na fase móvel para HPLC foi desionizada ($\mu\text{S}/\text{cm} \leq 0,055$; Seral Water Purification Systems, Munich, Germany).

Todos os produtos usados que não constam da lista anterior eram de qualidade *pro analysis*.

O Prelus foi adquirido numa farmácia.

5.1.2. Animais

As experiências foram realizadas tendo presentes as linhas de orientação ("guidelines") de "Principles of Laboratory Animal Care" (Publicação NIH nº 85-23, revista em 1985).

Utilizaram-se ratos Wistar (machos) de 200 a 300 gramas de peso. Os animais tiveram livre acesso a água e alimentos, foram mantidos a temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, a humidade compreendida entre 40 e 60% e a ciclos de dia/noite de 12/12 horas, pelo menos durante duas semanas antes do sacrifício.

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram sempre entre as 9 e as 10 horas da manhã.

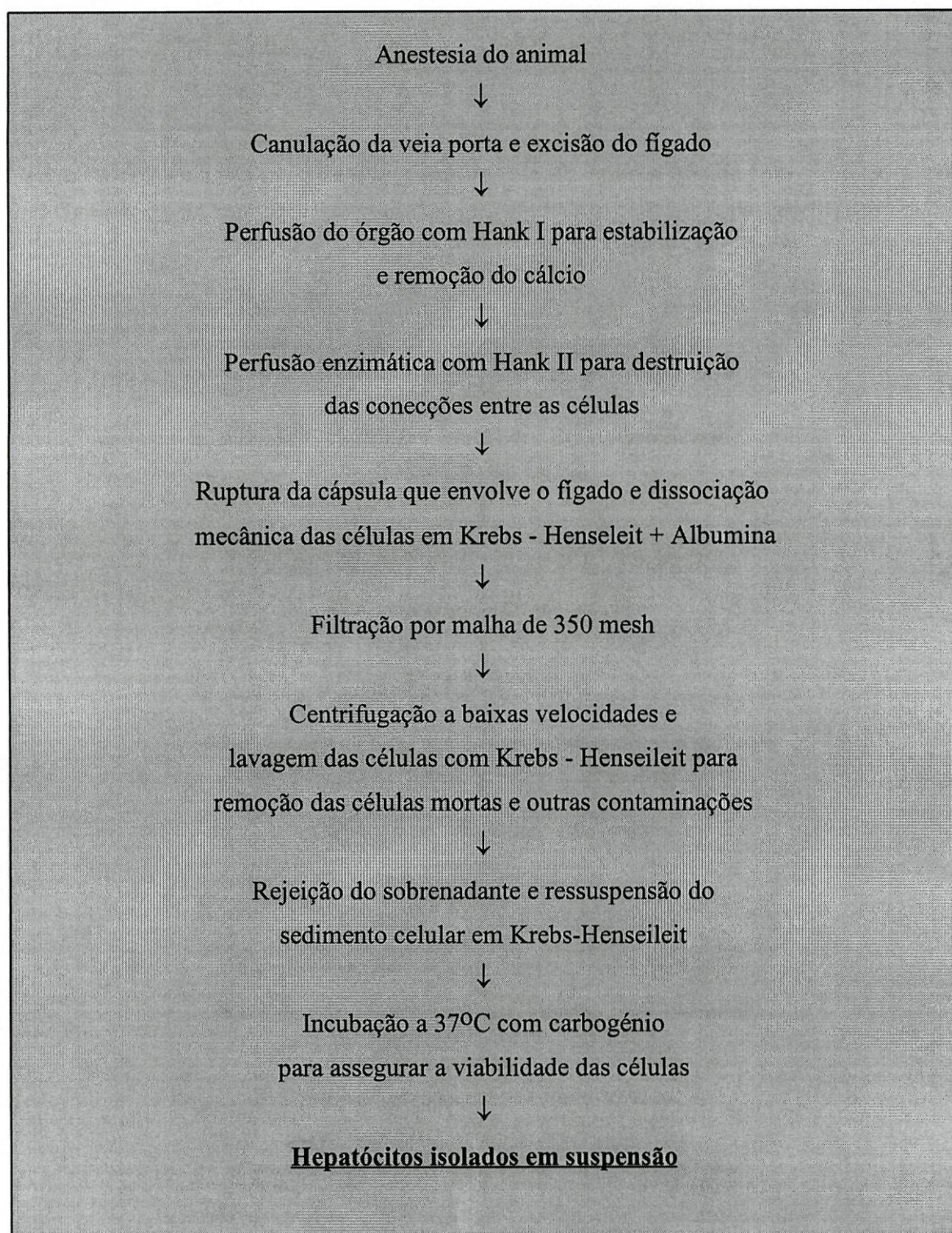
5.1.3. Preparação da suspensão de hepatócitos

O isolamento dos hepatócitos foi executado segundo o método de Moldéus *et al.*, 1978, também designado por “two-step perfusion”.

As técnicas para o isolamento de hepatócitos foram descritas em detalhe por Seglen, 1976, e têm sido aplicadas a várias espécies animais incluindo rato, ratinho, porco, carneiro, gato, peixe, aves, macaco e Homem (Berry *et al.*, 1991).

As células estão unidas por conexões cálcio-dependentes (complexos juncionais) e pela matriz celular, que é constituída por proteínas tipo colagénio. Os passos principais para se conseguir o isolamento são a perfusão do fígado *in situ* com soluções isentas de cálcio, contendo um agente quelante deste ião com a finalidade de diminuir a funcionalidade dos complexos juncionais, seguida de perfusão com uma solução de colagenase contendo cálcio para permitir a acção da enzima. A perfusão com colagenase completa a separação bioquímica dos hepatócitos, seguindo-se a separação mecânica. Após a remoção da cápsula que envolve o fígado, as células são libertadas e suspensas em meio apropriado. A fase que se segue ao isolamento das células do fígado consiste na purificação da suspensão de hepatócitos, que constitui o modelo usado neste trabalho. Os hepatócitos têm que ser separados dos outros tipos de células presentes no fígado, nomeadamente das células endoteliais e células de Kupffer, também denominadas células não parenquimatosas. Para tal, a suspensão celular é centrifugada e lavada por forma a remover os hepatócitos não viáveis e os outros tipos de células. Desta forma as células estão prontas para ser usadas em diferentes estudos (Vide figura 14) (Klaassen, *et al.*, 1982; Sasse *et al.*, 1992; Fernandes *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1996; Jewell *et al.*, 1996).

Figura 14. Técnica para se efectuar o isolamento de hepatócitos de rato.



A composição das soluções de perfusão e de incubação utilizadas (A,B,C,D) foi a seguinte (composição para a preparação de 1 litro de solução) (Quadro 3).

Quadro 3. Soluções salinas tamponadas

HANK modificado	A	B
NaCl	230 mM	230 mM
KCl	5,5 mM	5,5 mM
MgSO₄.7H₂O	0,8 mM	0,8 mM
Na₂HPO₄	0,3 mM	0,3 mM
NaHCO₃	25 mM	25 mM
KH₂PO₄	0,4 mM	0,4 mM
EGTA	0,06 mM	-
Albumina	0,67%	-
Colagenase	-	0,045 %
CaCl₂	-	0,12 %

KREBS-HENSELEIT modificado	C	D
NaCl	230 mM	230 mM
KCl	5,5 mM	5,5 mM
MgSO₄.7H₂O	1,4 mM	1,4 mM
KH₂PO₄	1,4 mM	1,4 mM
NaHCO₃	28,8 mM	28,8 mM
CaCl₂.2H₂O	3,0 mM	3,0 mM
Hepes	12,5 mM	12,5 mM
Albumina	1%	-

Em todas as soluções o pH foi ajustado a 7,4 com NaOH 1 N.

Todas as soluções foram arejadas com uma mistura gasosa constituída por 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogénio), e a temperatura estabilizada a 37° C, antes de serem

utilizadas. Esta mesma mistura gasosa foi também usada para o arejamento contínuo durante a perfusão do fígado e a incubação dos hepatócitos isolados.

5.1.4. Procedimento cirúrgico

Os ratos foram anestesiados com éter dietílico, sendo depois colocados em decúbito dorsal numa placa de dissecação, onde os membros foram convenientemente imobilizados.

Abriu-se a cavidade abdominal com uma incisão em forma de V, começando na base do abdómen e estendendo-se até um pouco acima do diafragma.

Expôs-se a veia porta hepática deslocando-se as vísceras para a direita. Passaram-se dois fios de algodão sob a veia porta, fez-se uma pequena incisão neste vaso a cerca de 1 cm do fígado, e introduziu-se rapidamente uma cânula através da qual gotejava a solução A e cujo fluxo foi regulado (cerca de 1 a 2 gotas por segundo), dando-se assim o início da perfusão *in situ*.

5.1.5. Sistema de perfusão

Na figura 15 está representado o sistema utilizado para perfundir o fígado com as soluções tamponadas e gaseificadas com carbogénio.

Este sistema é constituído por:

- Um suporte onde se colocam dois tubos que permitem a entrada e saída do líquido de cada um dos goblés, um com a solução A (HANK I + EGTA) e outro com a solução B (HANK II + collagenase), e a cânula com o fígado.
- Uma bomba peristáltica (bomba de perfusão) que permite a circulação das soluções de perfusão à velocidade de 10 ml/minuto.
- Dois reservatórios com cerca de 10 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, com quatro aberturas:

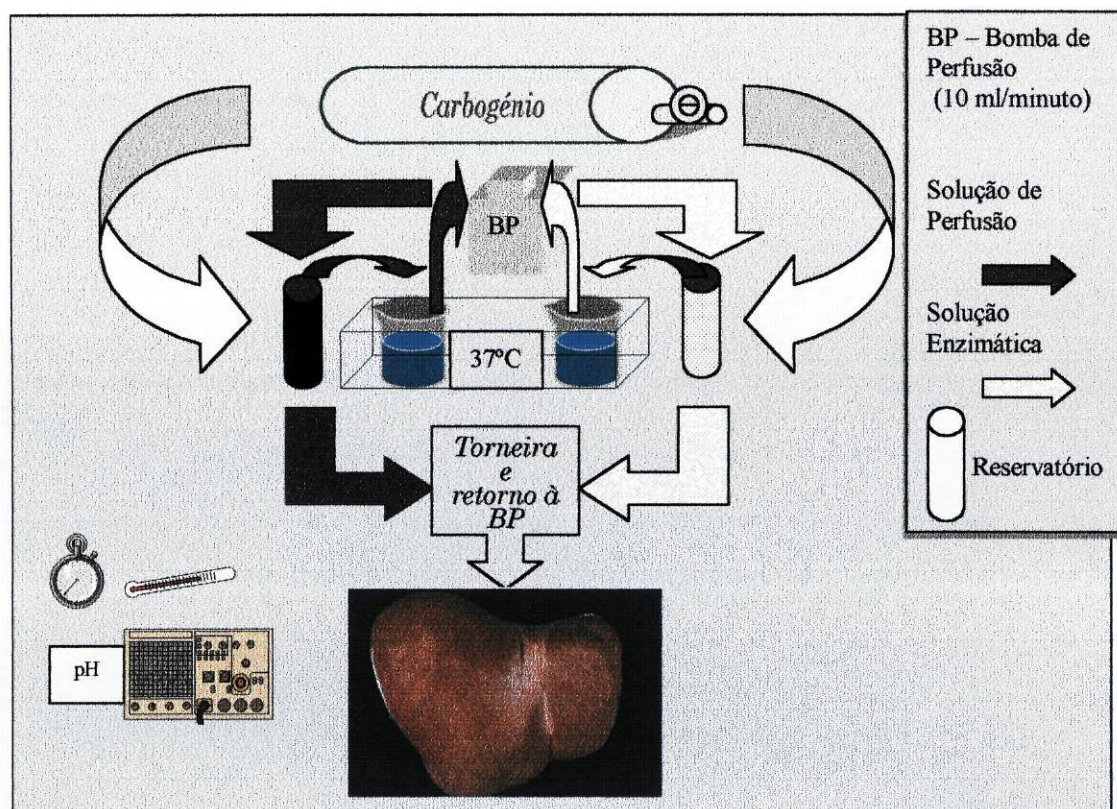


Figura 15 . Sistema de perfusão

1. uma abertura para a entrada da mistura gasosa, cuja pressão é regulada por um manómetro de pressão.
2. uma abertura para a entrada da solução (A ou B).
3. uma abertura para a saída da solução (A ou B), ligada a um tubo que possui um regulador de fluxo e uma cânula.
4. uma abertura para a saída da mistura gasosa e solução (A ou B) em excesso, que retorna ao goblé inicial, no caso de o débito desta solução ser superior à velocidade de perfusão do fígado.

5.1.6. Perfusão do fígado e isolamento dos hepatócitos

Após o início da perfusão *in situ* transferiu-se o fígado para um suporte sobre o goblé que continha a solução A, e manteve-se a perfusão durante 5 minutos.

Após este período, deixou-se sair completamente a solução A do reservatório de oxigenação, interrompeu-se o fluxo, por fracções de segundo, e deslocou-se o suporte com

a cânula e o fígado para o goblé que continha a solução **B** (dispersão enzimática). Continuou-se a perfusão durante 10 a 12 minutos, até o fígado denotar falta de plasticidade quando era pressionado levemente.

No final deste tempo, retirou-se o fígado da cânula e colocou-se na solução **C** (50 ml, à temperatura ambiente) num boião de polietileno.

Rompeu-se a cápsula que envolvia o fígado e dispersaram-se as células hepáticas com agitação suave (dispersão mecânica).

A suspensão obtida foi filtrada por um filtro de poliamida (350 mesh) para dois tubos de centrífuga de 50 ml. Centrifugou-se durante 1 minuto a 300 r.p.m e aspirou-se o sobrenadante.

Seguidamente, completou-se o volume dos tubos com solução **D** e agitou-se por inversão muito suave para lavar as células. Repetiu-se mais duas vezes a lavagem, centrifugação e aspiração do sobrenadante.

5.1.7. Contagem das células

Usando 100 μ l da suspensão obtida anteriormente diluída com 900 μ l de uma solução de azul de tripano (0,4 %), a contagem das células foi efectuada num hemacitómetro (Improved Double Neubauer, prof.: 0,100 mm; 0,0025 m²) ao microscópio óptico (40 x). A gota da suspensão homogeneizada por inversão suave do “eppendorf”, foi colocada na extremidade da lamela, previamente montada, para entrar na câmara de contagem por capilaridade. A aplicação da amostra fez-se rapidamente, para evitar a sedimentação selectiva das células intactas na pipeta, e em duplicado, usando os dois campos da câmara. Com base no número médio de células viáveis obtido, a suspensão foi diluída adicionando um volume apropriado de solução tampão de incubação (**D**) de forma a obter a concentração de células viáveis pretendida ($1,0 \times 10^6$ células/ml).

5.1.8. Caracterização das suspensões celulares obtidas

5.1.8.1. Determinação da viabilidade celular

Desde que se conhece esta técnica de isolamento de hepatócitos (Berry *et al.*, 1969), muitos dos esforços efectuados ao longo dos anos foram no sentido da obtenção

de um número cada vez mais elevado de hepatócitos viáveis, dado que eles são a principal unidade metabólica do fígado (Plaa and Charbonneau, 1994).

Os hepatócitos viáveis são aqueles que possuem morfologia normal, membrana plasmática íntegra, e funções bioquímicas normais. O objectivo de qualquer método para a preparação de células isoladas é, então, o de produzir o maior número possível de células intactas.

A qualidade da técnica de isolamento pode ser expressa pelo número total de células intactas obtidas, tendo em consideração a qualidade da suspensão celular (a percentagem das células viáveis) e o rendimento total de células (relativo à quantidade inicial de tecido).

Estas determinações têm uma aplicação prática importante, permitindo ter uma noção da eficiência do método, do número de incubações com o composto em estudo e também para decidir se, mediante a viabilidade e a proporção das células intactas obtidas, a experiência pode prosseguir ou não.

Na prática quando se pretende determinar a viabilidade, o que geralmente se avalia é a integridade da membrana plasmática. Esta integridade foi avaliada por dois métodos:

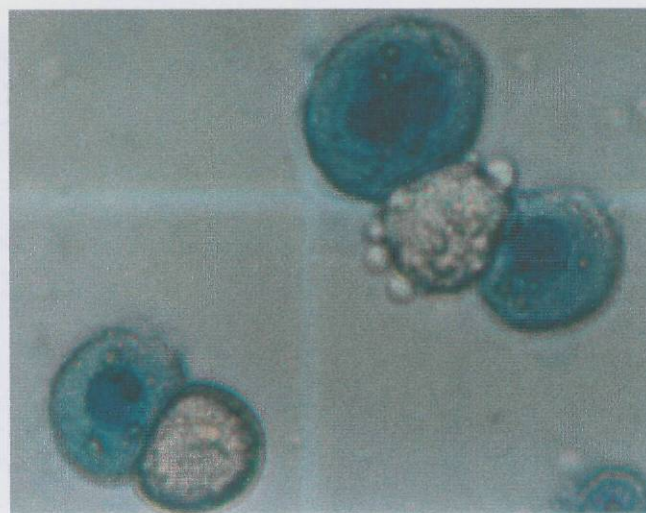
- Exclusão do azul de tripano
- Determinação da LDH libertada para o meio extracelular

5.1.8.1.1. Exclusão do azul de tripano

No passo inicial de contagem das células (5.1.7.), para poder diluir a suspensão para a concentração celular de trabalho, foi contado o número de células executando o teste de exclusão do azul de tripano. A contagem permite o cálculo da viabilidade da suspensão de hepatócitos, expressa em percentagem (Fariss, *et al.*, 1985; Loretz *et al.*, 1989; Berry *et al.*, 1992).

As células viáveis excluem o azul de tripano (corante orgânico azul com carga negativa que é excluído pelas células como resultado da manutenção do potencial de membrana dependente de energia) exibindo forma esférica de contornos bem definidos, aspecto refringente e cor amarela. As células danificadas são permeáveis ao azul de tripano apresentando-se coradas de uma forma particularmente intensa no núcleo (Seglen, 1976). Mesmo a mais leve coloração do núcleo foi considerada indicativa de lesão celular, incluindo-se estas células no número das não viáveis (Vide Figura 16).

Figura 16. Hepatócitos isolados em suspensão. (Gentilmente cedida por Félix Carvalho).



Técnica:

Preparou-se uma solução de azul de tripano a 0,4 % em NaCl 0,9%, tendo sido filtrada por filtro 0,22 μm .

A determinação da viabilidade ao longo de cada ensaio, por esta técnica, fez-se de forma aleatória, uma vez que era difícil em termos de trabalho laboratorial, proceder à sua determinação para todas as amostras após mistura de 100 μl da suspensão celular com 100 μl de azul de tripano.

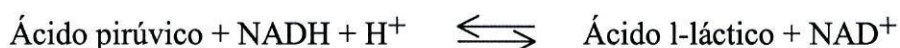
A contagem das células fez-se ao fim de 2 minutos, na área central (que correspondia a 10^{-4} ml), nos dois lados de uma câmara de Neubauer.

Para calcular a % da viabilidade celular, dividiu-se o número de células viáveis pelo número total de células (viáveis + não viáveis) e multiplicou-se por 100.

5.1.8.1.2. Liberação da LDH para o meio extracelular

A medida da libertação da enzima citosólica desidrogenase láctica (LDH) (EC 1.1.1.28) para o meio extracelular foi usada para avaliar a viabilidade inicial da suspensão assim como a sua variação ao longo do período de incubação das células com o Prelus ou com alguns dos seus componentes misturados ou isoladamente.

A LDH é uma enzima que se encontra no citoplasma das células e que participa no último passo da glicólise anaeróbica, catalizando a redução reversível do ácido pirúvico a ácido láctico:



Em contraste com a avaliação da viabilidade pelo teste de exclusão do azul de tripano, neste teste, não tem influência a possível ocorrência de lise celular, uma vez que se pode fazer uma estimativa exacta de danos celulares mesmo que as células danificadas se tenham desintegrado. Assim, e apesar de as células desintegradas terem desaparecido, a LDH correspondente a estas células encontra-se no sobrenadante e, sendo mensurável, traduz a extensão da perda de viabilidade celular (Berry *et al.*, 1992).

Além disso, são evitados os problemas estatísticos que surgem quando se recorre à técnica de exclusão do azul de tripano e que são devidos ao pequeno número de células que é examinado.

A medição de LDH não deve ser utilizada para a determinação da viabilidade celular na suspensão inicial, uma vez que durante a obtenção dos hepatócitos isolados as células são submetidas a várias lavagens, durante as quais a LDH libertada por células danificadas é removida (Jauregui *et al.*, 1981).

A quantidade de enzima no meio extracelular foi quantificada pela diminuição da absorvância a 340 nm quando o NADH é oxidado a NAD^+ .

1. Determinação da LDH extracelular

Retirou-se 500 μl de cada suspensão celular para um “eppendorf” e centrifugou-se a 6000 r.p.m. durante 10 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para outro “eppendorf” e manteve-se entre 0 e 4°C até ao doseamento da LDH.

2. Determinação da LDH total

Retirou-se 500 μl de cada suspensão celular para um “eppendorf” e manteve-se entre 0 e 4°C até se efectuar o doseamento da LDH total.

Após agitação em vortex, cada amostra foi desintegrada num sonicador (Vibracell 375 W sonicator, Sonics & Materials Danbury-USA) durante 10 segundos a uma

velocidade média e, depois, centrifugada a 6000 r.p.m. durante 10 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para outro “ependorf”.

A técnica que se utilizou resultou da adaptação de duas técnicas descritas por Bergermeyer, 1965 e por Korzeniewski, 1983 para doseamento de LDH.

Programou-se o leitor de placas (Ceres 9000) na função cinética, para absorção no comprimento de onda de 340 nm e registou-se a variação da absorvância a 340 nm, determinando-se assim a velocidade de desaparecimento do NADH com leituras de 5 em 5 segundos durante 1 minuto.

A forma como se colocou as amostras e o branco nas placas (96 poços, de fundo liso), foi de acordo com o seguinte esquema:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	
	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	
	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	
	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	

(A) (2-6)

20 µl de sobrenadante das amostras de LDH extracelular

140 µl de solução de piruvato de sódio (concentração final 128,6 mM)

140 µl de solução de NADH (concentração final 1,4 mM)

(C) (7-11)

20 µl de sobrenadante das amostras de LDH total

140 µl de solução de piruvato de sódio (concentração final 128,6 mM)

140 µl de solução de NADH (concentração final 1,4 mM)

(B)

Branco = 20 µl de Krebs-Henseleit modificado (solução **D**)

140 µl de solução de piruvato de sódio (concentração final 128,6 mM)

140 µl de solução de NADH (concentração final 1,4 mM)

As soluções de NADH e de piruvato foram preparadas extemporaneamente, em matrizes rolhados e protegidas da acção da luz.

Os resultados foram expressos em termos da % de LDH libertada (quantificada no sobrenadante), correspondendo a LDH total (100%) à que foi obtida após a lise total das células.

$$\% \text{ LDH extracelular} = \frac{\text{LDH extracelular}}{\text{LDH total}} \times 100$$

5.1.8.2. Teor em glutathiona reduzida (GSH)

A determinação dos níveis de GSH foi realizada por HPLC com detecção electroquímica, após precipitação das suspensões celulares com ácido perclórico e sonicação de acordo com a técnica desenvolvida por Carvalho *et al.*, 1994.

Retirou-se 200 µl de cada suspensão celular para um “eppendorf”, adicionou-se 200 µl de ácido perclórico (concentração final de 5%) e, após agitação no vortex, centrifugou-se a 6000 r.p.m. durante 10 minutos.

Filtrou-se o sobrenadante por um filtro de 0,45 µm, e injectou-se 100 µl de cada amostra num sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com Detector Electroquímico.

Os valores obtidos foram convertidos em nmoles GSH / milhão de células.

5.1.8.3. Teor em glutathiona oxidada (GSSG)

A determinação dos níveis de GSSG foi realizada por HPLC com detecção electroquímica, após incubação das amostras com redutase da glutathiona e NADPH, por forma a reduzir a GSSG a GSH, seguida de precipitação com ácido perclórico. Efectuou-se assim a medição da glutathiona total (GSH + GSSG), sendo a GSSG determinada por cálculo, subtraindo-se a GSH (obtida após redução) à glutathiona total de acordo com a técnica desenvolvida por Carvalho *et al.*, 1994.

Retirou-se 500 µl de cada suspensão celular para um “eppendorf”, adicionou-se 500 µl da mistura Tris/L-serina/Na-borato a pH 7,4 (concentração final de 50 mM / 27,8 mM / 55,6 mM).

As amostras foram, após agitação em vortex, desintegradas num sonicator, (Vibracell 375 W sonicator, Sonics & Materials Danbury-USA) durante 10 segundos a uma velocidade média (que se verificou ser a velocidade e o tempo necessários para a desintegração das células, por observação ao microscópio óptico).

Retirou-se 500 µl de cada amostra, às quais se adicionou redutase da glutathione (GR) e NADPH nas concentrações finais de 6 UI e 0,2 mM respectivamente.

Após a incubação com a enzima e o NADPH, durante 2 minutos, precipitou-se as amostras com ácido perclórico (concentração final de 5%) e centrifugou-se a 6000 r.p.m. durante 10 minutos.

Filtrou-se o sobrenadante por um filtro de 0,45 µm, e injectou-se 100 µl de cada amostra num sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com Detector Electroquímico, determinando-se, assim, a glutathione total.

Os valores obtidos foram convertidos, após terem sido efectuados os cálculos adequados, em nmoles GSSG / milhão de células.

5.1.8.4. Determinação da extensão da peroxidação lipídica

Os produtos primários da peroxidação lipídica são peróxidos que se cindem para formar compostos carbonilo. Um deles é o malonildialdeído (MDA) que forma um aducto cromogénico com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA). Assim, a reactividade do TBA com meios biológicos complexos pode ser considerada como um índice da sua peroxidação lipídica (Gutteridge, 1981). Neste trabalho, a extensão da peroxidação lipídica, que pode, então, ser caracterizada pela formação certos compostos, expressa em MDA, após a quebra de ácidos gordos poli-insaturados, foi quantificada com base na formação de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) com formação de um complexo de cor vermelha estável (Buege and Aust, 1978; Fernandes *et al.*, 1995).

Resumidamente, 250 µl de cada suspensão celular foram precipitados com 500µl de ácido tricloroacético a 10%.

Após agitação em vortex, as amostras foram centrifugadas a 6000 r.p.m. durante 20 segundos.

Retirou-se, depois, 500 µl de sobrenadante ao qual se adicionou igual volume de ácido tiobarbitúrico a 1% (preparação extemporânea).

A mistura foi aquecida durante 10 minutos num banho de água à ebulição e após arrefecimento, fez-se a leitura da absorvância a 535 nm num espectrofotómetro Shimadzu 160.

5.1.9. Resultados

No quadro 4 apresenta-se as principais características (valores médios) dos hepatócitos isolados obtidos.

Quadro 4. Resultados médios dos hepatócitos isolados em suspensão.

Características dos hepatócitos isolados obtidos	
Rendimento total de células vivas	180 a 300 x 10 ⁶ células
Viabilidade (%) (teste de exclusão do azul de tripano)	75 a 90 %
% LDH extracelular	16,21 ± 2,24
GSH (nmoles/milhão células)	59,8 ± 8,3
GSSG (nmoles/milhão células)	3,7 ± 2,3

Na execução do teste de exclusão do azul de tripano, observaram-se ao microscópio óptico células viáveis, de forma esférica, cor amarelada e membrana plasmática muito refringente, bem como células consideradas não viáveis, de forma esférica ou oval, exibindo um contraste brilhante entre o núcleo e o citoplasma, de cor azul (vide Figura 16). É frequente o aparecimento de vesículas na membrana plasmática das células, que se devem a alterações nos microfilamentos do citoesqueleto dos hepatócitos, e que podem ser reversíveis ou irreversíveis (conduzindo, neste caso a lise e, conseqüentemente à morte celular). Estas vesículas, que têm um aspecto translúcido e não contêm organelos, podem retrair após o período de pré-incubação a 37°C num meio arejado com carbogénio, tendo sido este o meio escolhido por nós para evitar este fenómeno (Berry *et al.*, 1991, Berry *et al.*, 1992).

5.2. APLICAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO NO ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DO PRELUS

5.2.1. Condições de incubação das células

A incubação da suspensão celular ($1,0 \times 10^6$ células/ml) fez-se por períodos de 4 horas, em matrizes de 50 ml de fundo largo, colocados num tabuleiro agitador de um banho termostático (37°C , 90 oscilações/minuto), que foram continuamente arejados por uma mistura gasosa de carbogénio humidificada. Em todas as experiências as células foram pré-incubadas durante 30 minutos.

Em cada matraz colocou-se uma alíquota da suspensão celular e a quantidade de solução de Krebs-Henseleit suplementada com 12,5 mM de Hepes a pH 7,4, por forma a que no final da adição de Prelus o volume total perfizesse 10 ml. Em todas as experiências foi efectuado um controlo constituído por uma alíquota da suspensão celular, e portanto, sem qualquer adição de Prelus. Ao fim de 1 hora de pré-incubação adicionou-se o volume de Prelus necessário para se obter a percentagem desejada para o estudo (mais precisamente 10, 5, 2,5 e 1,25 % (volume)).

Alíquotas de suspensão celular de cada matraz foram retiradas com intervalos de 60 minutos ao longo de 4 horas, para determinação da LDH extracelular, da GSH, da GSSG e da extensão da peroxidação lipídica.

Após preparação da suspensão de hepatócitos isolados, alíquotas de suspensão celular foram distribuídas por 5 matrizes com solução de Krebs-Henseleit suplementada com 12,5 mM de Hepes a pH 7,4, por forma a que, no final da adição de Prelus, o volume total perfizesse 10 ml.

Ao fim de 1 hora de incubação adicionou-se o Prelus, de forma a obter as % finais pretendidas: 1,25, 2,5, 5 e 10 % (volume). Um dos ensaios, sem qualquer adição de Prelus, serviu como controlo da experiência.

Ao longo da incubação, a tempos variáveis, foi executado o teste de exclusão do azul de tripano para determinação da viabilidade das células. Estas determinações foram aleatórias em termos dos matrizes escolhidos.

A avaliação quantitativa da citotoxicidade do Prelus ao longo do tempo foi feita pela medição da libertação da LDH para o meio extracelular. Foram, também, determinados os níveis de GSH e de GSSG, e as substâncias reactivas ao ácido

tiobarbitúrico, por forma a avaliar a toxicidade ao nível das funções bioquímicas dos hepatócitos.

5.2.2. Monitorização toxicidade

5.2.2.1. Libertação de LDH para o meio extracelular

Como já foi referido, a medida da libertação de LDH para o meio extracelular foi usada não só para avaliar a viabilidade no tempo zero, como também, ao longo do período de incubação, para monitorizar o eventual efeito citotóxico da forma farmacêutica em estudo. Em todos os protocolos experimentais foram efectuadas colheitas da suspensão celular no início (T=0) e ao fim de 1, 2, e 3 horas (T=1, T=2, T=3) de incubação das células com o medicamento em estudo e foram tratadas da forma anteriormente descrita (capítulo 5.1.8.1).

5.2.2.2. Determinação da glutathiona reduzida (GSH)

De acordo com a metodologia atrás descrita (capítulo 5.1.8.2), foram colhidas alíquotas de suspensão celular (200 µl), nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas. O sobrenadante resultante do tratamento de cada uma das amostras foi congelado a -20° C até à altura da sua análise por HPLC.

5.2.2.3. Determinação da glutathiona oxidada (GSSG)

De acordo com a metodologia atrás descrita (capítulo 5.1.8.3), foram colhidas alíquotas de suspensão celular (500 µl), nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas. O sobrenadante resultante do tratamento de cada uma das amostras foi congelado a -20° C até à altura da sua análise por HPLC.

5.2.2.4. Determinação da peroxidação lipídica

Seguindo a técnica anteriormente referida (capítulo 5.1.8.4), foram retiradas alíquotas de suspensão celular apenas no tempo correspondente às 3 horas (T=3), uma vez que se verificou, em estudos preliminares, que não se detectava peroxidação lipídica nos

outros tempos, servindo esta determinação essencialmente para uma confirmação da possível existência de peroxidação lipídica neste tempo.

5.2.3. Tratamento dos resultados

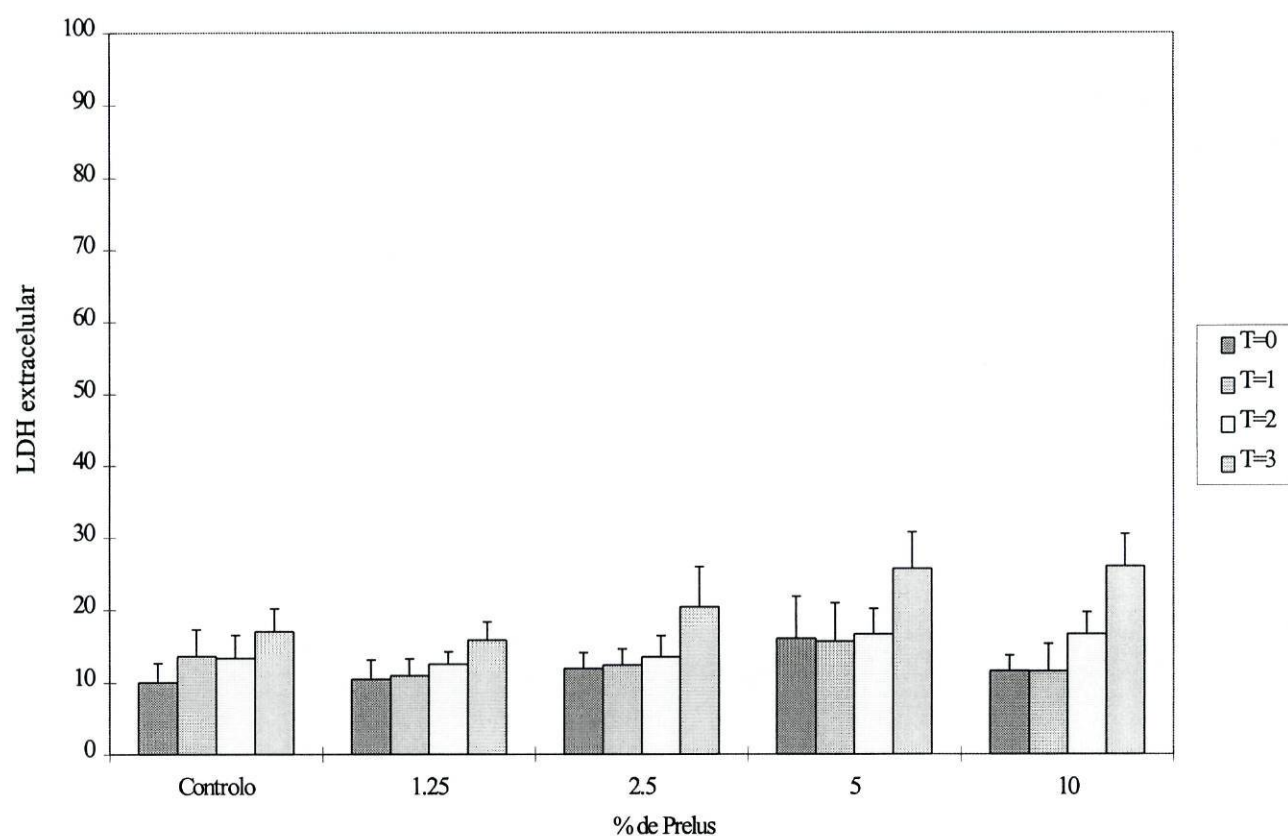
Os resultados apresentam-se sob a forma de médias \pm erros padrão, para o número de experiências que será referido oportunamente, para cada determinação. De salientar que cada experiência foi realizada com hepatócitos isolados de um rato diferente.

A análise estatística foi efectuada por análise da variância ("one-way" ANOVA), seguida pelo teste de Fisher ("Fisher Protected Least Significant Difference" - PLSD). As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

5.2.4. Resultados

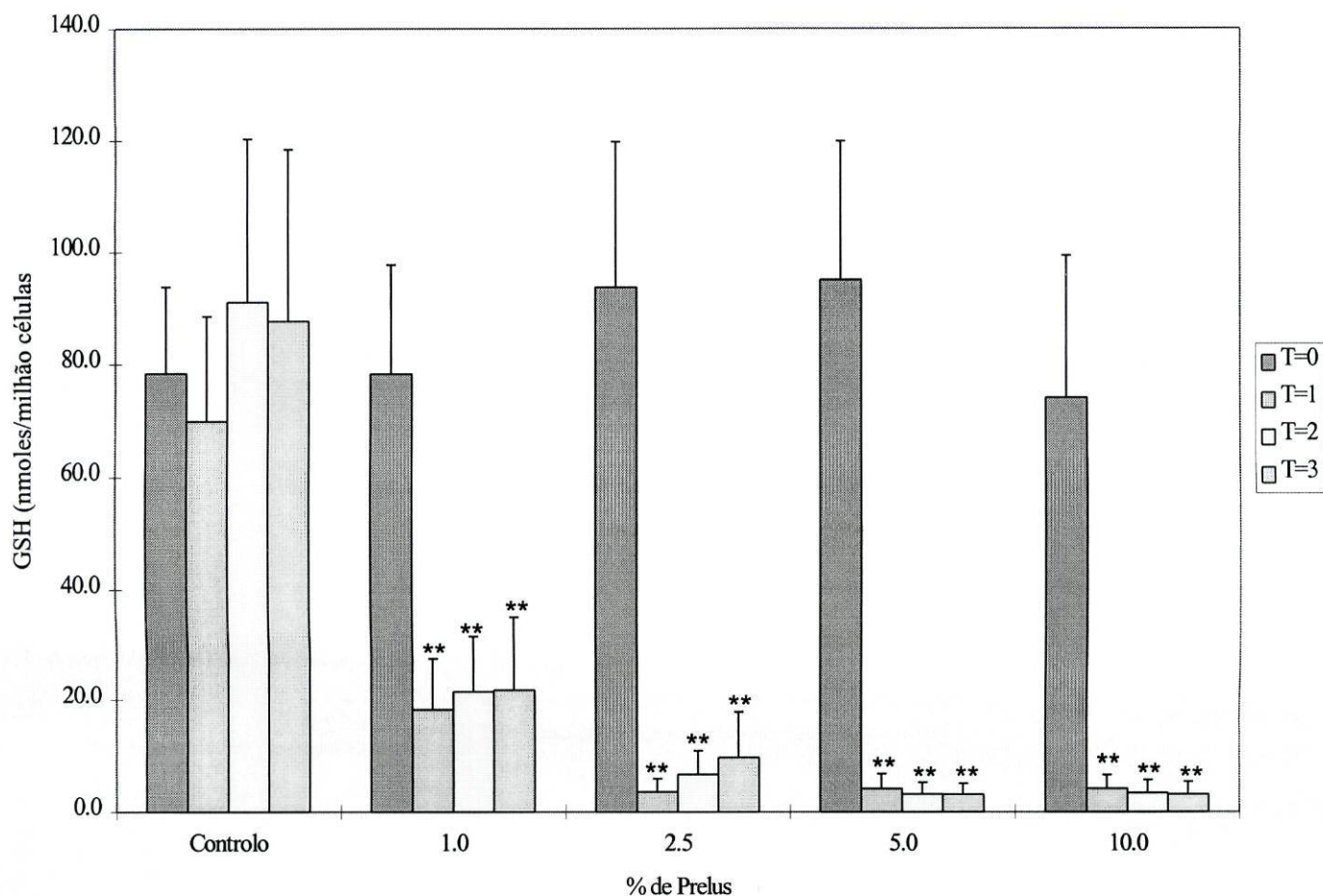
5.2.4.1. Liberação de LDH para o meio extracelular

Figura 17. Efeito do Prelus na viabilidade celular, expressa pela liberação de LDH, em hepatócitos isolados de rato, para o meio extracelular. Os hepatócitos foram incubados a 37° C com diferentes % de Prelus. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação (T=0, T=1, T=2, T=3) são apresentados sob a forma de médias \pm erros padrão, de 5 experiências diferentes.



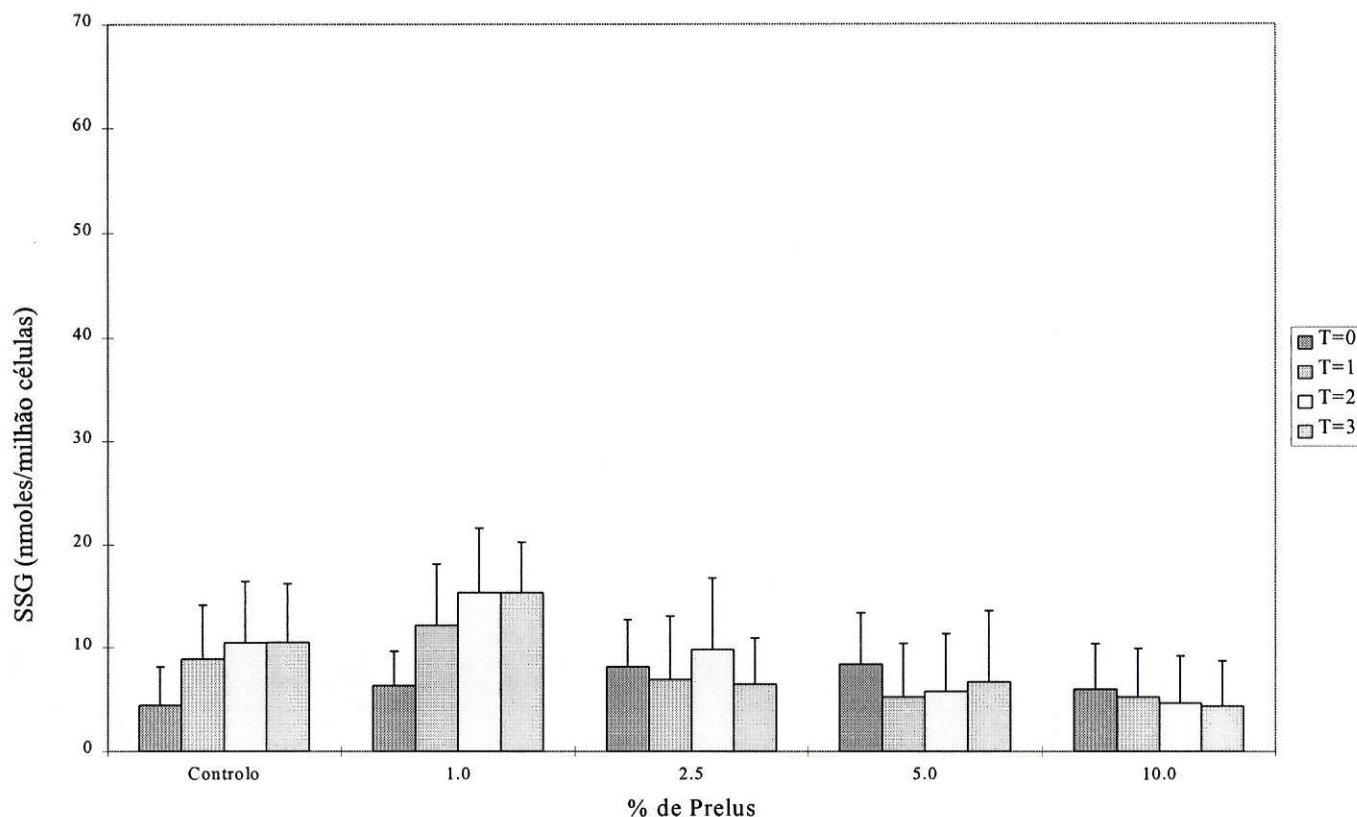
5.2.4.2. GSH

Figura 18. Efeito do Prelus no conteúdo de GSH em hepatócitos isolados de rato. Os hepatócitos foram incubados a 37° C com diferentes % de Prelus. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação (T=0, T=1, T=2, T=3) são apresentados sob a forma de médias \pm erros padrão, de 6 experiências diferentes. ** $p \leq 0,01$



5.2.4.3. GSSG

Figura 19. Efeito do Prelus na formação de GSSG em hepatócitos isolados de rato. Os hepatócitos foram incubados a 37° C com diferentes % de Prelus. Os valores referentes aos tempos 0, 1, 2 e 3 horas de incubação (T=0, T=1, T=2, T=3) são apresentados sob a forma de médias \pm erros padrão, de 6 experiências diferentes.



5.2.4.4. Extensão da peroxidação lipídica

Quadro 5. Valores médios de absorvância a 535 nm correspondentes ao T=3.

	Média (n=6)	±	Erro padrão
Controlo	0,016		0,002
10%	0,020		0,001
5%	0,022		0,001
2,5%	0,014		0,001
1,25%	0,014		0,001

5.3. APLICAÇÃO DE SUSPENSÕES DE HEPATÓCITOS ISOLADOS DE RATO NO ESTUDO DA HEPATOTOXICIDADE DE ALGUNS CONSTITUINTES ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO DO PRELUS - ISOPROTERENOL, ETANOL, VANILINA

Compostos testados:

- a. Isoproterenol**
- b. Etanol**
- c. Vanilina**
- d. Isoproterenol + Vanilina + Etanol**
- e. Isoproterenol + Vanilina**
- f. Isoproterenol + Etanol,**
- g. Vanilina + Etanol.**

5.3.1. Condições de incubação das células

A incubação da suspensão celular ($1,0 \times 10^6$ células/ml) fez-se por períodos de 1 hora, em matrizes de 50 ml de fundo largo, colocados num tabuleiro agitador de um banho termostático (37°C , 90 oscilações/minuto), que foram continuamente arejados por uma mistura gasosa de carbogénio humidificada. Em todas as experiências as células foram pré-incubadas durante 60 minutos.

Em cada matraz colocou-se uma alíquota da suspensão celular e a quantidade de solução de Krebs-Henseleit suplementada com 12,5 mM de Hepes a pH 7,4, por forma a que no final da adição do composto(s) o volume total perfizesse 10 ml. Em todas as experiências foi efectuado um controlo constituído por uma alíquota da suspensão celular, e portanto, sem a adição de qualquer composto. Ao fim de 1 hora de pré-incubação adicionou-se, então, o volume de composto(s) necessário para se obter a percentagem desejada para o estudo, correspondente à quantidade existente na forma farmacêutica (2,5 %).

Alíquotas de suspensão celular de cada matraz foram retiradas nos tempos correspondente ao tempo zero ($T=0$) e 1 hora ($T=1$) de incubação, para determinação da LDH extracelular, da GSH, da GSSG e da extensão da peroxidação lipídica.

Após preparação da suspensão de hepatócitos isolados, alíquotas de suspensão celular foram distribuídas por 5 matrizes com solução de Krebs-Henseleit suplementada

com 12,5 mM de Hepes a pH 7,4, por forma a que, no final da adição do(s) composto(s), o volume total perfizesse os 10 ml.

Ao fim de 1 hora de incubação adicionou-se o(s) composto(s), de forma a obter a % final pretendida (correspondente à % que existia nos 2,5 % de Prelus). Um dos matrizes, sem qualquer adição de composto(s), servia sempre como controlo de cada experiência.

Nos tempos zero e 1, foi executado o teste de exclusão do azul de tripano, para determinação da viabilidade das células. Estas determinações foram aleatórias em termos de suspensões escolhidas.

A avaliação quantitativa da citotoxicidade dos componentes, isolados ou em associação ao longo do tempo, foi feita pela medição da libertação da LDH para o meio extracelular. Foram, também, determinados os níveis de GSH e de GSSG, e as substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico.

5.3.2. Monitorização da toxicidade ao longo das incubações

5.3.2.1. Libertação de LDH para o meio extracelular

Como já foi referido, a medida da libertação de LDH para o meio extracelular foi usada não só para avaliar a viabilidade no tempo zero como também, no final do período de incubação, para monitorizar o eventual efeito citotóxico do(s) composto(s) ensaiado(s). Em todos os protocolos experimentais foram efectuadas colheitas da suspensão celular no início (T=0) e ao fim de 1 hora (T=1) de incubação das células com o(s) composto(s) em estudo e foram tratadas da forma anteriormente descrita (capítulo 5.1.8.2), havendo apenas uma alteração no modo de aplicação das amostras nas placas.

A forma como se colocou as amostras e o branco nas placas (96 poços, de fundo liso), foi de acordo com o seguinte esquema, para a LDH extracelular:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)			
	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)			
	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)	(A)			
	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)			

(A) (2-6)

20 µl de sobrenadante das amostras de LDH extracelular

140 µl de solução de piruvato de sódio (concentração final 128,6 mM)

140 µl de solução de NADH (concentração final 1,4 mM)

(B)

Branco = 20 µl de Krebs-Henseleit modificado (solução D)

140 µl de solução de piruvato de sódio (concentração final 128,6 mM)

140 µl de solução de NADH (concentração final 1,4 mM)

e, para a LDH Total:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)			
	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)			
	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)	(C)			
	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)	(B)			

(C) (7-11)

20 µl de sobrenadante das amostras de LDH total

140 µl de solução de piruvato de sódio (concentração final 128,6 mM)

140 µl de solução de NADH (concentração final 1,4 mM)

(B)

Branco = 20 µl de Krebs-Henseleit modificado (solução D)

140 µl de solução de piruvato de sódio (concentração final 128,6 mM)

140 µl de solução de NADH (concentração final 1,4 mM)

5.3.2.2. Determinação da glutathiona reduzida (GSH)

De acordo com a metodologia atrás descrita (capítulo 5.1.8.3), foram colhidas alíquotas de suspensão celular (200 µl), nos tempos 0 e 1 hora. O sobrenadante resultante do tratamento de cada uma das amostras foi congelado a -20° C até à altura da sua análise por HPLC.

5.3.2.3. Determinação da glutathiona oxidada (GSSG)

De acordo com a metodologia atrás descrita (capítulo 5.1.8.4), foram colhidas alíquotas de suspensão celular (500 µl), nos tempos 0 e 1 hora. O sobrenadante resultante do tratamento de cada uma das amostras foi congelado a -20° C até à altura da sua análise por HPLC.

5.3.2.4. Determinação da peroxidação lipídica

Seguindo a técnica anteriormente referida (capítulo 5.1.8.4), foram retiradas alíquotas de suspensão celular nos tempos correspondentes a 0 e 1 hora.

5.3.3. Tratamento dos resultados

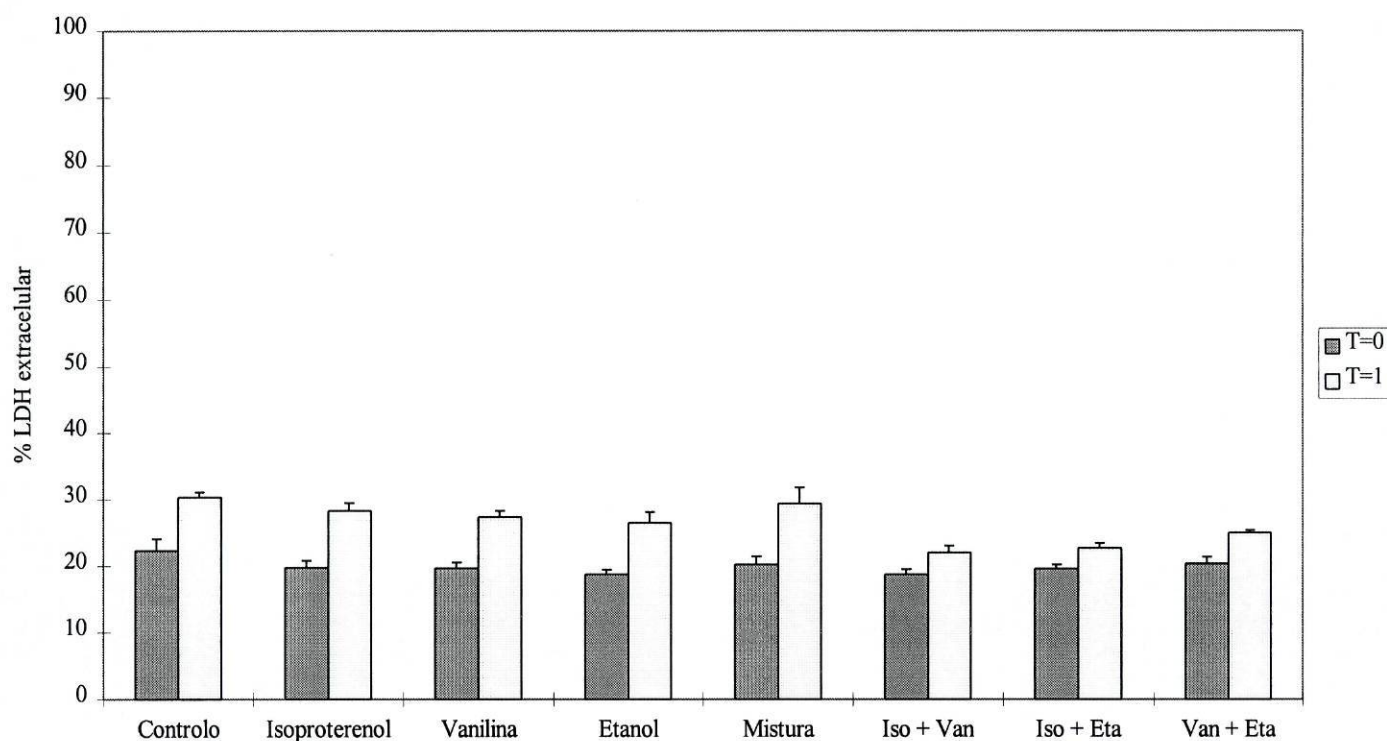
Os resultados apresentam-se sob a forma de médias \pm erros padrão, para o número de experiências que será referido oportunamente, para cada determinação. De salientar que cada experiência foi realizada com hepatócitos isolados de um rato diferente.

A análise estatística foi efectuada por análise da variância ("one-way" ANOVA), seguida pelo teste de Fisher ("Fisher Protected Least Significant Difference" - PLSD). As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

5.3.4. Resultados

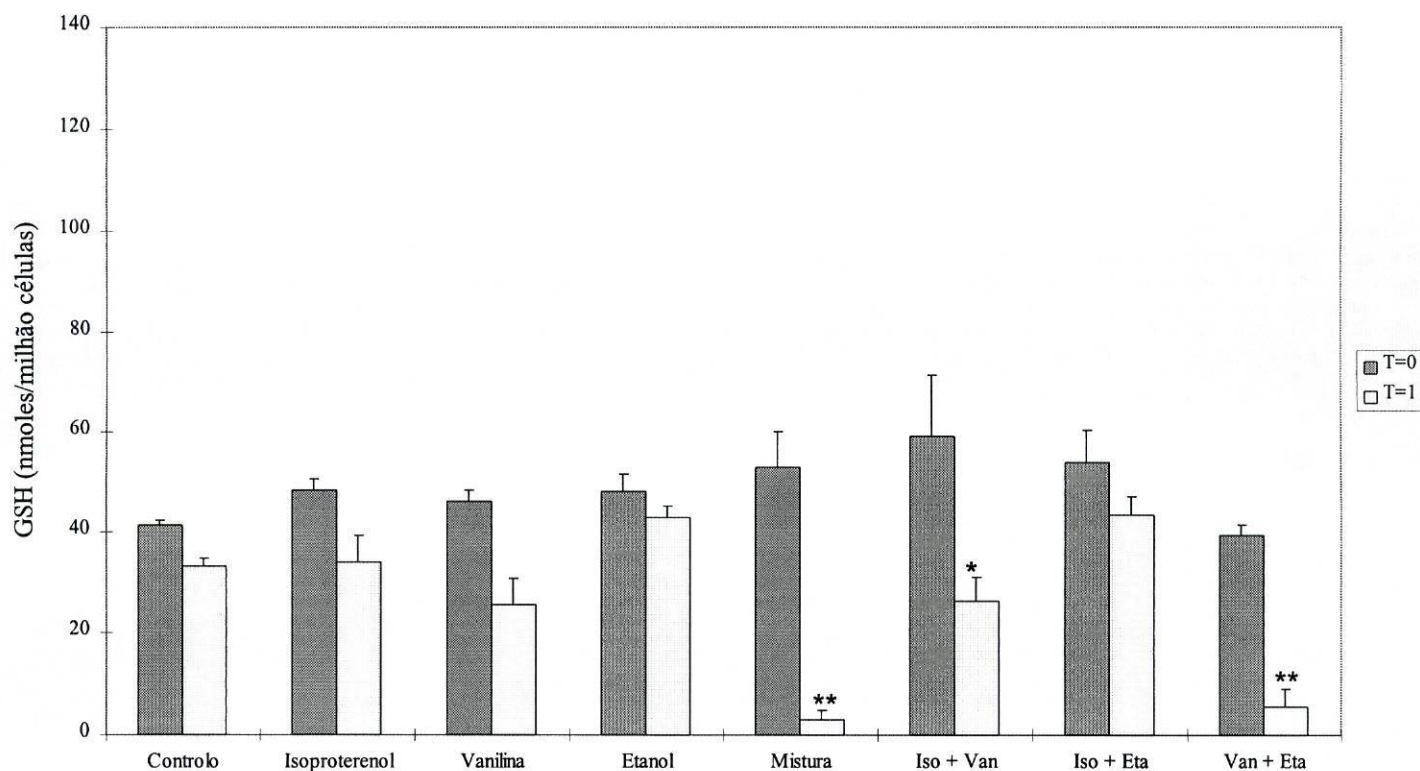
5.3.4.1. Liberação de LDH para o meio extracelular

Figura 20. Efeito do(s) composto(s) testados na viabilidade celular, expressa pela liberação de LDH, em hepatócitos isolados de rato para o meio extracelular. Os hepatócitos foram incubados a 37° C com o(s) diferentes(s) composto(s). Os valores referentes aos tempos 0 e 1 hora de incubação (T=0, T=1) são apresentados sob a forma de médias \pm erros padrão, de 5 experiências diferentes.



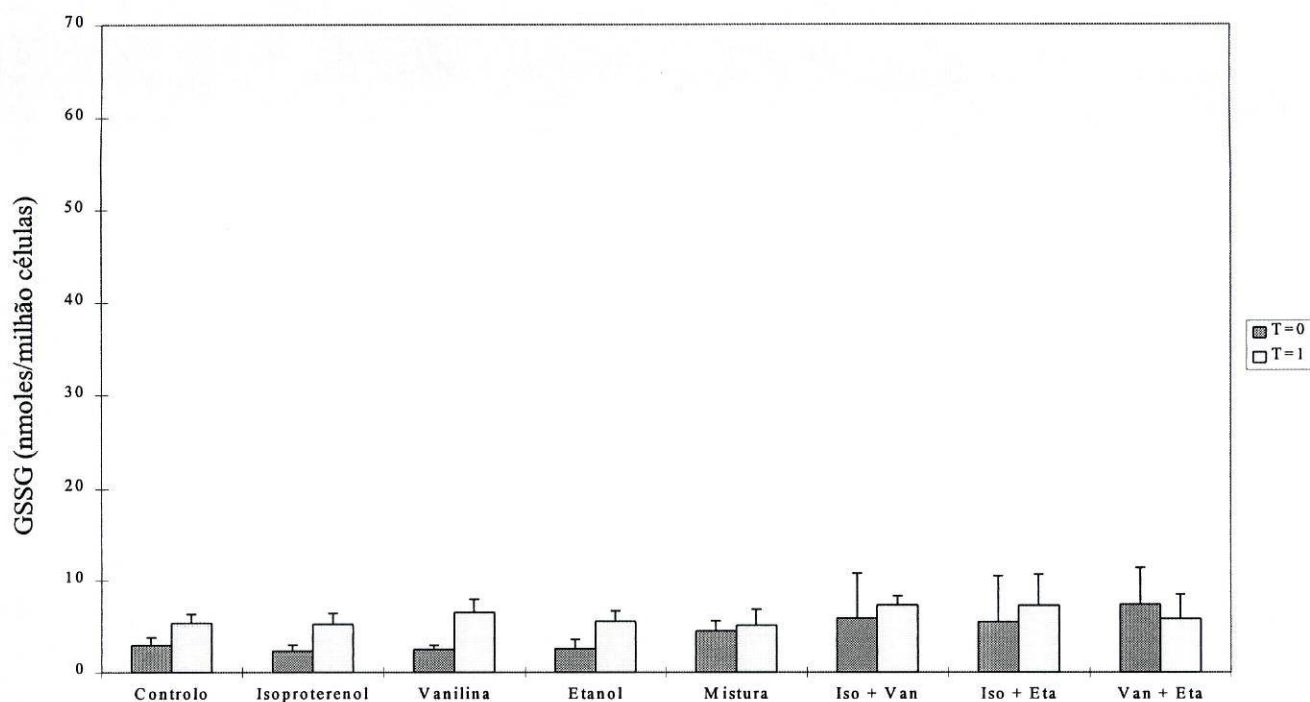
5.3.4.2. GSH

Figura 21. Efeito do(s) composto(s) testados no conteúdo de GSH em hepatócitos isolados de rato. Os hepatócitos foram incubados a 37° C com o(s) diferente(s) composto(s). Os valores referentes aos tempos 0 e 1 hora de incubação (T=0, T=1) são apresentados sob a forma de médias \pm erros padrão, de 5 experiências diferentes.



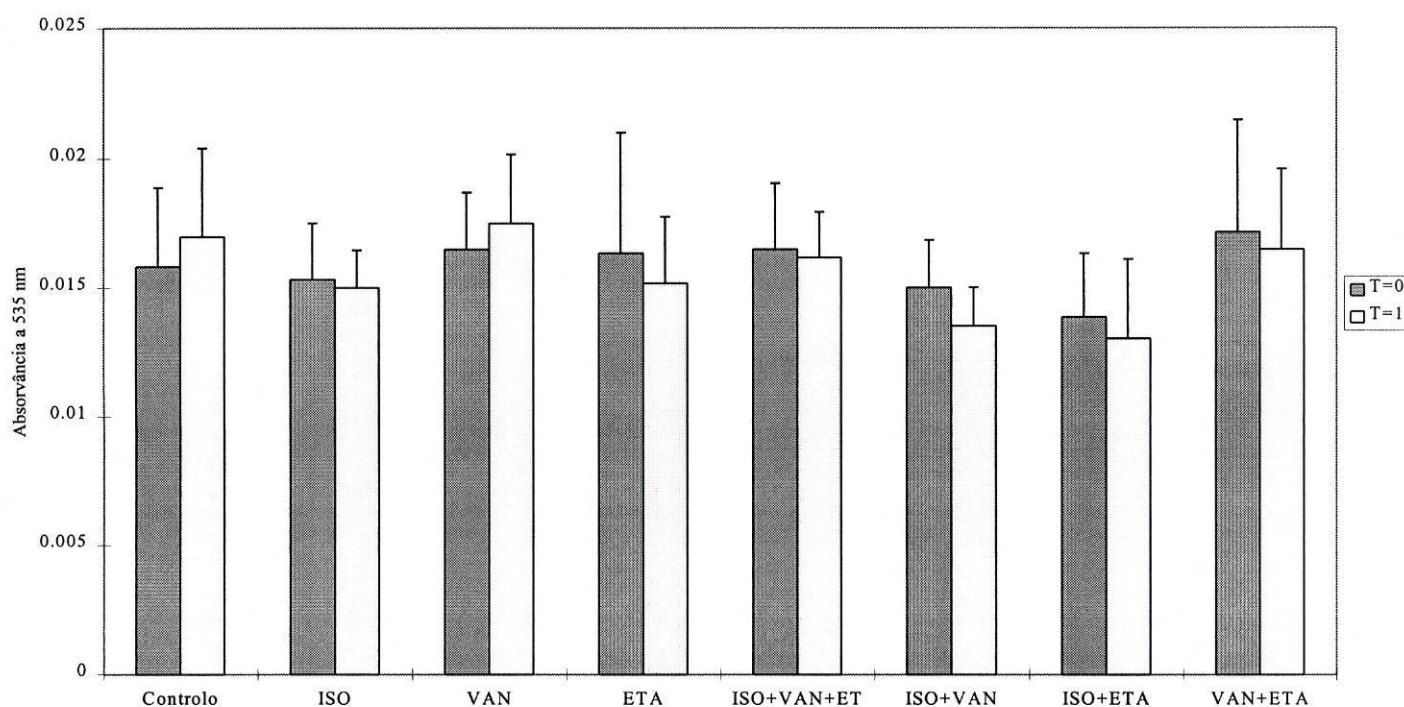
5.3.4.3. GSSG

Figura 22. Efeito do(s) composto(s) testados na formação de GSSG em hepatócitos isolados de rato. Os hepatócitos foram incubados a 37° C com o(s) diferente(s) composto(s). Os valores referentes aos tempos 0 e 1 hora de incubação (T=0, T=1) são apresentados sob a forma de médias \pm erros padrão, de 5 experiências diferentes.



5.3.4.4. Extensão da peroxidação lipídica

Figura 23. Efeito do(s) composto(s) testados na formação substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico em hepatócitos isolados de rato. Os hepatócitos foram incubados a 37° C com o(s) diferente(s) composto(s). Os valores referentes aos tempos 0 e 1 hora de incubação (T=0, T=1) são apresentados sob a forma de médias \pm erros padrão, de 6 experiências diferentes.



Discussão dos Resultados

6. DISCUSSÃO

6.1. RENDIMENTO E VIABILIDADE DAS SUSPENSÕES CELULARES

Os hepatócitos isolados em suspensão têm sido utilizados numa grande variedade de disciplinas, na Bioquímica, na Farmacologia e na Toxicologia quer em estudos fundamentais quer aplicados. As razões que levam à popularidade deste sistema *in vitro* incluem, tal como já foi referido anteriormente, considerações éticas e económicas, o elevado crescimento no conhecimento sobre os aspectos técnicos que envolvem a preparação de hepatócitos isolados, a relativa facilidade com que, actualmente, se consegue obter uma preparação homogénea com um só tipo de células, a elevada capacidade que os hepatócitos têm para a metabolização dos compostos e, em particular, o enorme valor científico torna possível utilizar um sistema biológico, bem controlado, para estudos mecanísticos.

Para promover uma utilização adequada e padronizada deste modelo, foi criado um centro europeu - ECVAM ("European Centre for the Validation of Alternative Methods") - que tem como principais objectivos promover a aceitação científica e legal dos métodos alternativos, que são da maior importância para as Ciências da Vida e que reduzem, racionalizam ou substituem o uso de animais de experiência. Uma das primeiras prioridades deste centro foi o de implementar procedimentos por forma a informar sobre o estado da arte, no desenvolvimento e validação dos testes que não utilizam animais inteiros, e sobre a possibilidade de incorporar estes testes nos procedimentos legais. Este centro, que é bastante conceituado na área da Toxicologia, promove sessões de debate com peritos em diversos assuntos relacionados com a Toxicologia e sugere que sejam tomadas em consideração uma série de recomendações por forma a facilitar a implementação destes sistemas *in vitro* e uniformizar as suas características (Blaabouer *et al.*, 1993). Destaca-se a qualidade da collagenase usada parecer ser o factor determinante da eficiência de dispersão das células, existindo comercializados diversos tipos de collagenases, com diferentes conteúdos em impurezas proteolíticas, às quais são atribuídas vantagens selectivas na dispersão celular de diferentes tecidos, levando a diferentes resultados no isolamento de hepatócitos. O Centro recomenda, então, que devem ser feitos esforços no sentido de garantir um rigoroso controlo de qualidade desta enzima e, inclusivamente, que o ECVAM deverá ser detentor de uma collagenase padrão para poder disponibilizar aos investigadores. Daqui se depreende que a pureza da collagenase tem sido uma preocupação constante para os investigadores que trabalham com suspensões de hepatócitos isolados, o que se revelou,

igualmente, nas nossas experiências. Para obviar esta dificuldade técnica procedeu-se à aquisição de várias embalagens da enzima, que se ensaiaram e, depois de se ter estabelecido qual o melhor lote, adquiriu-se quantidade suficiente para as subseqüentes experiências. No nosso laboratório foi usada uma colagenase (Sigma, tipo I) que vem contaminada com proteases não específicas que são, surpreendentemente, as responsáveis por uma melhor dispersão do tecido hepático.

Mais importante do que a quantidade de células isoladas (rendimento) revelou-se a qualidade das mesmas, ou seja, a percentagem de células viáveis em cada suspensão obtida. É claramente preferível, após o processo de isolamento, obter um menor número de células na sua maioria íntegras, do que uma grande quantidade de células não viáveis. Por este motivo, após a perfusão do fígado, a sua dispersão mecânica deve ser feita de forma cuidadosa, evitando correr o risco de, ao pretender obter mais células com uma dispersão mais enérgica, contribuir para a perda de viabilidade da suspensão final.

A variabilidade da viabilidade celular obtida ao longo das experiências deste trabalho foi também elevada e, nalguns casos, levou mesmo à não utilização das suspensões obtidas em protocolos experimentais. As suspensões celulares utilizadas para as experiências realizadas neste trabalho tinham uma viabilidade compreendida entre 75 e 90%. Estes valores encontram-se dentro dos referidos por outros autores tais como, Morgan, que em 1995 publicou um trabalho em que obteve hepatócitos isolados em suspensão com uma viabilidade celular inicial de 80%, com ratos da espécie "Wistar". Também Stubberfield e Cohen, em 1988, apresentaram resultados em termos de viabilidade da suspensão inicial da ordem dos 80 a 85%, com ratos da espécie "Wistar". Existem, no entanto, autores que apresentam valores superiores de viabilidade das suspensões de hepatócitos iniciais, como p. ex., Fernandes *et al.*, 1995 e Carvalho *et al.*, 1996 e em 1997, com 85 a 95% de viabilidade (trabalhos efectuados neste laboratório), e Cobreros, *et al.*, em 1997, com uma viabilidade de aproximadamente 90%, todos estes resultados obtidos com ratos da espécie "Wistar". Nakagawa e Moldéus, em 1992, com ratos da espécie "Sprague-Dawley", apresentaram uma viabilidade para a suspensão de hepatócitos recentemente isolada de 90 % e Rossi *et al.*, em 1986, com uma viabilidade que ronda os 85 a 99%, também com ratos da espécie "Sprague-Dawley". Palmeira *et al.*, em 1994, com uma viabilidade na suspensão celular inicial de 90%, com ratos da espécie "Wistar". Existem trabalho publicados por outros autores que apresentam valores de viabilidade celular ainda mais exigentes como Timbrell *et al.*, em 1998, que apresenta

valores de viabilidade inicial superiores a 92%, com ratos da espécie “Sprague-Dawley”, e Günther, *et al.*, 1992, com viabilidade de 95 %, em ratos da espécie “Wistar”. O método utilizado por todos estes investigadores para avaliarem a viabilidade inicial das suspensões de hepatócitos de ratos foi igualmente o método adoptado por nós nas nossas experiências.

O número de células obtido em cada preparação apresentou elevada variabilidade entre 180 a 300 x 10⁶ células por animal, o que é referido, igualmente por outros autores, desde praticamente os primórdios da preparação deste modelo de trabalho (Högberg e Kristoferson, 1977). Em parte, este facto pode ser explicado pelo peso variável dos ratos usados (200-300 g) mas, acontece que, num conjunto de ratos com peso uniforme, verificou-se grandes diferenças no rendimento da preparação, o que nos leva a concluir que esta variação também é, em parte, dependente, das próprias características de cada animal.

Analizando cronologicamente a variabilidade da viabilidade inicial das suspensões obtidas neste trabalho parecem determinantes dois factores: o lote de collagenase usado, já discutido anteriormente, e a experiência ou treino na preparação do modelo. A eventual variação que possa ocorrer na actividade da enzima quando se utiliza o mesmo lote, será provavelmente resultante das condições de armazenamento durante o transporte, e do seu grau de contaminação por proteases não específicas, constituindo assim, duas das possíveis causas de variação repentina da viabilidade celular, que se mantém enquanto se usa a mesma embalagem.

Por outro lado, independentemente da qualidade da collagenase usada, verificou-se ao longo do tempo uma melhoria gradual da viabilidade inicial média das suspensões celulares obtidas (assim como uma menor variabilidade) o que parece traduzir a importância da experiência ou treino na sua preparação. Associada a este facto pode estar uma maior rapidez de execução de todo o processo, desde a técnica cirúrgica até à contagem dos hepatócitos viáveis isolados, o que também se adquire com a experiência. No nosso trabalho verificou-se que na última série de experiências, correspondente às experiências descritas no capítulo 5.3., a média da viabilidade rondou os 85%, o que efectivamente comprova, que o treino é mesmo fundamental. Segundo a nossa experiência, a eficiente e rápida canulação da veia porta, de forma a assegurar a perfusão rápida e homogénea de todos os lóbulos hepáticos, é muito importante para o resultado final da preparação, em termos não só de rendimento como também de viabilidade celular, verificando-se que as zonas do fígado que não mudam imediatamente de cor quando se

inicia a perfusão (que em termos reais indicia uma canulação deficiente) correspondem, posteriormente, a zonas não digeridas pela collagenase.

Para comparar a viabilidade celular conseguida pelos diversos autores que trabalham com este modelo, o teste de exclusão do azul de tripano, que reflecte o grau de alterações irreversíveis na permeabilidade da membrana plasmática é, muitas vezes, o único critério de que dispomos, o que se comprova pelos elevado número de trabalhos publicados que utilizam este teste (como p.exs., Klaassen, 1982; Rossi *et al.*, 1986; Stubberfield e Cohen, 1988; Nakagawa e Moldéus, 1992; Palmeira *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 1996; Cobreros, *et al.*, 1997; Timbrell *et al.*, 1998). A inerente subjectividade da metodologia de contagem visual de células, assim como a eventual falta de padronização das condições de execução da operação, são apontadas como inconvenientes na comparação de resultados. No entanto, a crítica mais frequente a este método de avaliação da viabilidade celular, é a sua falta de sensibilidade a alterações funcionais que podem comprometer a sobrevivência das células e são anteriores à lesão irreversível da membrana plasmática, não sendo por isso detectáveis segundo este critério (Klaassen, 1982). Assim, o teste discrimina apenas células mortas de células mais ou menos viáveis, segundo outros parâmetros. Apesar da actual multiplicidade de critérios propostos para avaliação da viabilidade, tais como o método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (designado normalmente por teste do MTT), o teste de captação do vermelho neutro e os valores da ALT e AST no meio extracelular (Jauregui *et al.*, 1981; Klaassen, 1982; Berry *et al.*, 1992; Blaabouer, 1992; Guzzie, 1994; Barile, 1994; López *et al.*, 1996; Timbrell *et al.*, 1998, Ramos, 1998), a simplicidade, rapidez e baixo custo de execução do teste de exclusão do azul de tripano fazem dele o mais vulgarmente usado na avaliação da viabilidade das suspensões de células obtidas por vários autores (Klaassen, 1982; Rossi *et al.*, 1986; Stubberfield e Cohen, 1988; Nakagawa e Moldéus, 1992; Palmeira *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 1996; Cobreros, *et al.*, 1997; Timbrell *et al.*, 1998). Por estas razões, não existem dúvidas de que o método de exclusão do azul de tripano é a forma mais rápida e prática para determinar a viabilidade dos hepatócitos na suspensão inicial, durante a fase preparativa e, como primeira aproximação, para a determinação da proporção de células mortas que pode ser calculada contando o número de células coradas e relacionando-a com o número total de células por contagem em câmara de Neubauer. Outro factor determinante que nos levou a adoptar este método, foi a necessidade de no final do processo de isolamento dos hepatócitos haver a necessidade de se saber rapidamente o número de células viáveis. Sómente depois desta contagem, se poderá

efectuar os cálculos para realizar a diluição final por forma a obter a concentração de células viáveis adequada a cada incubação, que no nosso caso foi de 1 milhão de células por cada mililitro de solução.

A reversibilidade das alterações morfológicas verificadas nos hepatócitos imediatamente após o processo de isolamento (que, em parte, podem ser consequência de outras alterações funcionais igualmente reversíveis) tornam recomendável um curto período de pré-incubação das células, em condições favoráveis à recuperação da sua “normalidade” funcional e morfológica, que contribui não só para a melhoria da qualidade das preparações em termos absolutos, como também para uma maior uniformidade das condições iniciais em cada experiência, diminuindo assim o erro resultante da comparação de resultados obtidos com preparações qualitativamente muito diferentes.

Posteriormente, quando se comparou a viabilidade das suspensões, assim avaliada (verificado de forma aleatória ao longo de cada ensaio, daí que não sejam apresentados os resultados), com o resultado obtido segundo o critério baseado na libertação da LDH intracelular verificou-se uma boa correlação entre ambos, que é também referida por outros autores (Jauregui *et al.*, 1981; Berry *et al.*, 1992; Palmeira *et al.*, 1994).

Os valores de LDH extracelular obtidos nas várias suspensões celulares iniciais variaram entre 14 e 18%. A bibliografia refere valores próximos destes, como o trabalho realizado por Palmeira *et al.*, 1994, com uma % de LDH extracelular no grupo controlo que ronda os 10%, o trabalho realizado por Fernandes *et al.*, em 1995, com uma % de LDH extracelular de aproximadamente 20%, e por Carvalho *et al.*, em 1997 com uma % de LDH extracelular de aproximadamente 16%, estes dois últimos efectuados neste mesmo laboratório. Outro investigador, Nakagawa *et al.*, 1992, trabalhando com uma espécie de ratos diferente, “Fisher-344”, e com uma técnica diferente, obteve valores para a LDH extracelular próximos de 10%, que estão, portanto, de acordo com os nossos resultados.

6.1.1. LDH extracelular em hepatócitos isolados incubados com o medicamento em estudo

Conforme se verifica no gráfico apresentado na Figura 17, não houve uma variação significativa nos valores obtidos para a % de LDH extracelular após contacto com as diferentes concentrações do medicamento e durante os diferentes tempos de estudo. Este facto indica-nos que não há diminuição da viabilidade das suspensões de hepatócitos quando incubadas com o medicamento em estudo, segundo o método adoptado.

6.1.2. LDH extracelular em hepatócitos isolados incubados com isoproterenol, vanilina e etanol isoladamente ou em associação

Previamente à discussão dos resultados obtidos com a incubação destes compostos far-se-á uma abordagem às razões que nortearam a sua selecção, de entre todos os constituintes do medicamento, para a prossecução dos estudos. Estes compostos apresentam características estruturais e de toxicidade, algumas delas já referidas no capítulo 4, que nos levaram a levantar a hipótese de poderem provocar hepatotoxicidade. Destaca-se a vanilina, como já foi referido (capítulo 4.1.2.), pela sua estrutura química e pelo facto de ser um dos produtos resultante da oxidação do eugenol que, por sua vez, tem uma hepatotoxicidade conhecida (Thompson *et al.*, 1989; Mizutani *et al.*, 1991; Mizutani *et al.*, 1991b; Bolton *et al.*, 1995; Gerosa *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1998; Bodell *et al.*, 1998). O etanol pelos seus efeitos hepatotóxicos sobejamente conhecidos (capítulo 4.1.7.). Quanto ao isoproterenol (capítulo 4.1.1.), apesar de não existir qualquer publicação, do nosso conhecimento, sobre a avaliação dos seus efeitos em hepatócitos isolados, ele é um indutor do “stress” oxidativo em sistemas *in vitro* que utilizam p.ex., cardiomiócitos (Remião *et al.*, 1998; Remião *et al.*, 1999).

Como se pode verificar pelos resultados indicados no gráfico apresentado na Figura 20, quando se incubou as suspensões de hepatócitos com isoproterenol, vanilina e etanol isoladamente ou em associação, não houve variação significativa da viabilidade celular. Estes resultados são então semelhantes aos obtidos com o medicamento.

6.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

6.2.1. Glutathiona reduzida

Todo o processo de preparação das suspensões envolve sempre algum grau de perturbação dos mecanismos que mantêm a homeostasia da GSH. Atendendo ao papel deste nucleófilo na protecção das células contra os efeitos tanto de “stress” oxidativo como de conjugação com electrófilos formados durante a biotransformação de xenobióticos, o teor inicial das suspensões em GSH assume, do ponto de vista toxicológico, particular relevância podendo a sua depleção originar células anormalmente susceptíveis relativamente a um eventual efeito tóxico dos compostos a estudar.

Uma das características dos hepatócitos é exactamente o seu elevado teor em GSH (0,5 a 1 mM). Para a manutenção deste valor contribui a pré-incubação das células durante 60 minutos previamente aos ensaios a efectuar, permitindo às células recuperar das agressões físicas e químicas causadas pela perfusão e processos mecânicos de dispersão durante a operação de isolamento. Esta fase de pré-incubação das suspensões celulares, uniformizando as suas características, contribui, igualmente, para uma comparação mais correcta entre diferentes preparações utilizadas em estudos toxicológicos ou metabólicos nos quais a GSH possa ter um papel preponderante.

Os valores iniciais de GSH obtidos nas várias suspensões celulares variaram entre 51,5 e 68,1 nmoles/milhão de células, como se pode ver no Quadro 4. A bibliografia refere valores próximos destes, concretamente Nakagawa *et al.*, 1992, com valores de GSH de aproximadamente 50 nmoles/milhão de células, com uma espécie de ratos diferente, “Fisher-344”. Não obstante, outros autores referem valores mais elevados, em suspensões de hepatócitos de ratos “Wistar”, como o trabalho realizado por Fernandes *et al.*, em 1995, com valores que rondam 78 nmoles GSH /milhão de células, e outros apresentam valores de GSH mais baixos, nomeadamente Palmeira *et al.*, 1994, com valores da ordem das 25 nmoles/milhão de células e por Carvalho *et al.*, em 1996, com valores aproximadamente 40 nmoles/milhão de células, e por Carvalho *et al.*, em 1997, com valores aproximadamente 47 nmoles/milhão de células.

6.2.1.1. GSH em hepatócitos incubados com o medicamento em estudo

Conforme se verifica, pela observação dos resultados apresentados em forma de gráfico na Figura 18, o medicamento provoca uma depleção acentuada dos valores da GSH, para todas as concentrações testadas e para todos os tempos de incubação, verificando-se uma relação concentração/efeito.

Estes resultados fazem-nos suspeitar, pelo facto de não haver um aumento proporcional da GSSG, que poderá haver formação de conjugado(s) entre algum(s) componente(s) de Prelus ou de metabolitos desses mesmos compostos, com a GSH.

6.2.1.2. GSH em hepatócitos incubados com isoproterenol, vanilina e etanol isoladamente ou em associação

Conforme referido acima, os teores de GSH eram já significativamente depletados após incubação durante 1 hora com o medicamento em estudo. Sendo assim, prosseguimos os ensaios para avaliação da toxicidade dos compostos seleccionados isoladamente ou em associação, apenas para 1 hora de contacto com as células. A concentração escolhida foi a correspondente a 2,5% de Prelus.

Como se pode observar na Figura 21, não houve diferenças significativas nos conteúdos de GSH dos hepatócitos incubados com isoproterenol, vanilina e etanol isoladamente.

Comparando uma experiência realizada por Dianzani, 1985, em hepatócitos isolados de ratos, da espécie Wistar, com os valores de GSH obtidos após incubação das suspensões celulares com etanol, na concentração testada, verifica-se que os valores de GSH obtidas pelo referido investigador são muito próximas (40 nmoles/milhão de células) das obtidas por nós (aproximadamente 48 nmoles/milhão de células).

Também a associação do isoproterenol com o etanol na concentração correspondente à existente em 2,5% de Prelus, não provocou diminuição significativa dos conteúdos de GSH. No entanto, a mistura dos três compostos ensaiados provocou um abaixamento acentuado da GSH (49,8%) ($p < 0,01$).

Verificou-se igualmente abaixamento significativo da GSH nas células ensaiadas com vanilina + etanol (33,8%) ($p < 0,01$) bem como com o isoproterenol + vanilina (32,6%) ($p < 0,05$).

Observando os resultados obtidos, verifica-se que a mistura dos três compostos provoca, tal como o medicamento integral, um abaixamento significativo da GSH ($p < 0,01$). Nenhum dos compostos isoladamente provoca alterações significativas deste parâmetro, mas a associação da vanilina com o isoproterenol e da vanilina com o etanol afectam de forma significativa os conteúdos de GSH das células ($p < 0,05$). Ao contrário, o isoproterenol em associação com o etanol não originaram qualquer alteração no conteúdo do tripéptido. Somos então levados a responsabilizar a vanilina, quando em associação com os outros constituintes, pelo abaixamento da GSH.

Aparentemente, sendo atribuída à vanilina uma propriedade antioxidante, parecem inesperados estes resultados. Porém, estudos recentes demonstram que esta molécula pode em determinadas circunstâncias apresentar características pró-oxidantes (Liu *et al.*, 1993).

Embora de forma especulativa, pode atribuir-se um provável efeito sinérgico na depleção da GSH causado pela vanilina, uma vez que isoladamente ela não provoca abaixamento significativo e, na sua presença, este efeito verifica-se, quando associada ao etanol. Se adicionarmos o valor correspondente ao abaixamento no conteúdo de GSH para estes compostos quando isolados, verifica-se que o resultado é superior à simples adição dos valores. Em relação à sua associação com o isoproterenol não se verifica um efeito sinérgico mas sim apenas aditivo.

6.2.2. Glutathiona oxidada

Os valores iniciais de GSSG obtidos nas várias suspensões celulares rondam os 4,4 nmoles/milhão de células. A bibliografia refere valores próximos destes, concretamente Nakagawa *et al.*, 1992, com valores de GSSG de aproximadamente 4 mnmoles/milhão de células, embora em ratos de uma espécie diferente, "Fisher-344". Outros investigadores, com a mesma espécie (ratos "Wistar") obtiveram resultados inferiores como, Carvalho *et al.*, em 1996, com valores de aproximadamente 2 nmoles/milhão de células. E outros obtiveram níveis de GSSG mais elevados, como Fernandes *et al.*, em 1995 e Carvalho *et al.*, em 1997, com valores próximos de 7 nmoles/milhão de células e ainda Palmeira *et al.*, 1994, com valores da ordem 6 mnmoles/milhão de células.

Conforme se verifica nas Figuras 19 e 22, houve uma apreciável variabilidade de valores, e não houve variações significativas nos conteúdos de GSSG presentes nas suspensões ensaiadas com o medicamento e com o isoproterenol, a vanilina e o etanol isoladamente ou em associação. Pode, então, depreender-se que não ocorre o fenómeno de oxidação da glutathiona, uma vez que embora os níveis de GSH baixassem, não houve um aumento proporcional da GSSG.

6.2.3. Peroxidação lipídica

Os valores de peroxidação lipídica foram obtidos por uma técnica que se baseia na formação de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica apresenta alguns inconvenientes como, o facto de o ácido tiobarbitúrico reagir com diversas substâncias, ou seja, não ser específico para o malonildialdeído, como p.ex., outros aldeídos que se podem formar, em menores quantidades e que são igualmente resultantes da peroxidação lipídica (Berry *et al.*, 1992); o facto de se utilizarem ácidos fortes e de ser

necessário calor para o processamento da reacção, poder dar origem à formação artificial de malonildialdeído; outro aspecto é o facto de não detectar outros compostos resultantes da peroxidação, nomeadamente os hidrocarbonetos. Mas, no entanto, e apesar destas limitações, este teste é considerado um bom teste de “screening” e, como os resultados obtidos nas experiências efectuadas foram negativos em termos de expressão de peroxidação lipídica, não se justificava fazer outro tipo de determinações para avaliar a peroxidação lipídica (Vide Quadro 5 e Figura 23).

A peroxidação lipídica e os danos celulares a ela subjacentes são um mecanismo importante no “screening” da toxicidade de vários xenobióticos (como p.ex., tetracloreto de carbono, diquato, paraquato, paracetamol, etanol). No presente estudo, como não houve expressão de peroxidação lipídica comparativamente aos ensaios controlo, de acordo com o teste de “screening” efectuado, somos levados a pensar em três hipóteses: 1) a composição do medicamento em termos de compostos não activos, nomeadamente em antioxidantes, exerce algum efeito protector das células, apesar da complexa mistura que o constitui, 2) os sistemas antioxidantes presentes nas células, que incluem além de várias enzimas, o ascorbato, o alfa-tocoferol e outros sistemas redutores celulares, são eficazes numa certa extensão, mesmo quando há uma depleção da GSH (Nakagawa *et al.*, 1992b), 3) a formação de ROS e de outras moléculas capazes de induzir a peroxidação lipídica foi baixa, pelo que não houve peroxidação lipídica nos hepatócitos em suspensão incubados de acordo com os protocolos estabelecidos.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

1. O medicamento em estudo provocou uma depleção significativa de GSH em hepatócitos isolados de rato, em todas as concentrações estudadas observada para todos os tempos de incubação.
2. O isoproterenol, a vanilina e o etanol compostos constitutivos do medicamento em estudo, quando incubados isoladamente não provocaram alterações significativas nos níveis deste tripéptido. A vanilina em associação com o isoproterenol ou com o etanol, provocou uma depleção significativa da GSH.
3. O medicamento estudado não provocou citotoxicidade nos hepatócitos isolados de rato, nas condições estudadas, pois em todas as experiências realizadas não houve diminuição da viabilidade celular. Apesar de em algumas situações ter provocado uma depleção acentuada da GSH, sem aumento proporcional da GSSG, essa depleção nunca atingiu níveis suficientemente baixos para inviabilizar as células.
4. A vanilina quando associada ao etanol e incubada, na concentração estudada, com hepatócitos isolados em suspensão, teve um efeito sinérgico na depleção dos níveis de GSH.
5. Os resultados obtidos permitem questionar o uso de medicamentos com várias moléculas dotadas de actividade biológica, principalmente se considerarmos dois aspectos:
a) actualmente existe uma forte tendência política, no que respeita à Autorização de Introdução de Medicamentos no Mercado Farmacêutico, em tentar evitar a autorização de medicamentos que tenham na sua composição várias moléculas activas pois, é muito difícil prever os seus efeitos no organismo, que é já por si bastante complexo, evitando desta forma que surjam efeitos como os que nós detectámos p. ex., de sinergismo entre dois compostos (não se tornou numa situação tóxica no estudo que se realizou mas, poderá haver situações em que este tipo de efeitos seja muito grave) e b) que a uma determinada doença poderão estar associados uma diversidade de factores, fisiológicos, químicos ou mesmo ambientais, que poderão provocar uma exacerbação dos efeitos de um determinado medicamento, que poderia, à partida, não ser um potencial hepatotóxico.

Mensagem Final

O elevado número de células obtido, cada vez que se utiliza este modelo, aliado à facilidade de manipulação das mesmas, permite executar simultaneamente incubações em condições experimentais muito variadas. Desta forma, as células obtidas numa única preparação, que obrigam ao sacrifício de apenas um animal, podem ser incubadas com diferentes fármacos, em diferentes concentrações de um mesmo fármaco, na presença de agentes de protecção celular específicos ou de outras substâncias que interferem com a biotransformação de xenobióticos (p.ex., inibidores competitivos ou não competitivos de certas vias de biotransformação), entre outros. Em qualquer caso são sempre possíveis comparações simultâneas entre o controlo e os hepatócitos incubados com o(s) compostos(s) em estudo, provenientes da mesma suspensão inicial, diminuindo o erro decorrente de factores de variação não controláveis entre preparações. Achamos ser esta uma grande potencialidade da aplicação dos modelos que usam hepatócitos isolados em suspensão, permitindo uma aplicação do conceito inicialmente já aqui definido denominado por “4R’s”.

No que respeita ao medicamento estudado nesta dissertação, apesar de, nas condições estudadas ele não ter provocado uma depleção de glutathione considerada significativa para ser lesiva para os hepatócitos isolados em suspensão, estes mesmos hepatócitos se fossem sujeitos ao efeito tóxico de outro(s) agente(s) oxidante(s) e/ou electrofílico(s), poderiam sofrer de forma bastante expressiva a agressão destas espécies reactivas. Diariamente todos nós estamos expostos a vários tipos de agentes agressores, daí que seja importante salientar que cada vez mais se tenta impedir a autorização de introdução no mercado, nacional e internacional, de medicamentos que apresentem na sua composição moléculas biologicamente activas.

As moléculas activas em associação são aquilo a que, correntemente, se poderá chamar por “caixinha de surpresas” e nós, especialistas do medicamento, temos que estar permanentemente atentos às surpresas que os compostos moleculares nos reservam.

Investigar, sempre e mais, com procedimentos adequados, e controlo de qualidade é o que se deseja...

Anexo 1

Resumo das Características do Medicamento (Anexo 1)

1. Denominação da Especialidade Farmacêutica

PRELUS ELIXIR COMPOSTO

2. Forma Farmacêutica, dosagem, via de administração e apresentação:

2.1. Forma farmacêutica

Elixir.

2.2. Dosagem

Cada 5 ml contém 15 mg de Teofilina anidra, 2,0 mg de Fenobarbital, 4,0 mg de Sulfato de efedrina, 0,83 mg de Cloridrato de isoproterenol, 50,0 mg de Iodeto de potássio e 816 mg de álcool.

2.3. Via de administração

Via oral

2.4. Apresentação

Frasco de 200 ml.

3. Propriedades Farmacológicas

As propriedades farmacológicas do produto são as resultantes das diferentes actividades farmacológicas dos seus princípios activos.

Os constituintes activos do Prelus elixir composto podem agrupar-se nas seguintes categorias farmacoterapêuticas:

I - Broncodilatadores

A. Cloridrato de isoproterenol

B. Teofilina

C. Sulfato de efedrina

II - Fluidificante das secreções

D. Iodeto de potássio

III - Sedativo

E. Fenobarbital

4. Informações clínicas

4.1. Indicações terapêuticas: Tratamento de doentes com asma brônquica, tosse de etiologia alérgica e bronquite crónica.

4.2. Contra-indicações: Hipersensibilidade para o iodo, ou quaisquer outros produto.

4.3. Efeitos indesejáveis: Em raros casos o PRELUS elixir composto poderá determinar sintomas de hiperestimulação simpática, tais como taquicardia e nervosismo.

Nesses casos a administração deverá ser suspensa e retomada depois a nível posológico mais baixo.

As reacções ao iodo incluem coriza, febre, erupções acneiformes, eritema da face e do tórax e tumefacção dolorosa das glândulas salivares.

A teofilina pode causar intolerância gástrica (náuseas e vómitos). Estes efeitos secundários desaparecem rapidamente após a suspensão do medicamento.

4.4. Precauções particulares de emprego: A posologia deverá ser cuidadosamente ajustada em doentes com hipertiroidismo, insuficiência cardíaca, e hipertensão, assim como nos indivíduos hipersensíveis às aminas simpaticomiméticas, dado que hiperdosagem poderá resultar em taquicardia, palpitação, náuseas, cefaleias ou outros efeitos colaterais do tipo adrenérgico.

Recomenda-se igualmente prudência nos doentes com hipertrofia prostática e glaucoma.

4.5. Utilização em caso de gravidez e lactação: A administração do PRELUS elixir composto está contra-indicada em mulheres grávidas ou em período de aleitamento.

4.6. Interações medicamentosas: Nas doses recomendadas, não há interações medicamentosas ou outras com expressão clínica.

4.7. Posologia:

Doses parciais:

Crianças: De 1 a 3 anos 1 ou 2 colheres de chá (5 a 10 ml)

De 3 a 6 anos 2 ou 3 colheres de chá (10 a 15 ml)

De 6 a 12 anos 1 ou 2 colheres de sopa (15 a 30 ml)

Adultos: 2 colheres de sopa (30 ml)

A dose parcial pode ser repetida nas crianças 2 ou 3 vezes por dia, se necessário, para controlar os sintomas.

A dose parcial para adultos pode ser repetida até 4 vezes ao dia.

4.8. Sobredose: Dadas as proporções em que os princípios activos entram na composição de PRELUS elixir composto, as consequências mais gerais que decorrem de uma eventual sobredose são resultantes dos efeitos tóxicos das aminas simpaticomiméticas, principalmente em indivíduos hipersensíveis.

Sinais e sintomas:

- Taquicardia
- Elevações da pressão sistólica com queda da pressão diastólica
- Palpitações
- Perturbações gastrointestinais
- Sudação
- Tremores
- Cefaleias
- Nervosismo

Tratamento:

- a) Esvaziamento gástrico precoce
- b) Medidas gerais de suporte, particularmente da função cardíaca, que deve ser estreitamente vigiada.
- c) Tratamento sintomático.

4.9. Cuidados especiais: Não há cuidados especiais a observar durante a terapêutica com este medicamento, excepto os indicados sob a epígrafe precauções.

4.10. Efeitos sobre a condução de veículos e o uso de máquinas: Dado o efeito sedante do fenobarbital, PRELUS elixir composto poderá interferir com a capacidade de conduzir veículos ou manejar máquinas.

5. Informações farmacêuticas

5.1 Incompatibilidade: Não tem.

5.2. Duração de estabilidade: 5 (cinco) anos.

5.3. Precauções particulares de conservação: Não se recomendam quaisquer precauções particulares.

5.4. Natureza e conteúdo do recipiente: Frasco de vidro âmbar, de 200 ml de capacidade e tampa “astra”, o qual por sua vez é colocado em caixa de cartolina Cromoduplex 310 g/cm², com fundo automático.

5.5. Nome e sede social do titular da autorização de colocação no mercado (AIM)

5.5.1. Nome

STERLING-WHINTHROP, Produtos Farmacêuticos, Lda.

5.5.2. Sede

Carrascal de Manique, freguesia de Alcabideche, concelho de Cascais.

6. Composição da especialidade farmacêutica

A especialidade Prelus Elixir Composto responde à fórmula abaixo:

Princípios activos:

Teofilina anidra	15,00 mg / 5 ml	0,300 % (p/v)
Fenobarbital	2,00 mg / 5 ml	0,040 % (p/v)
Sulfato de efedrina	4,00 mg / 5 ml	0,080 % (p/v)
Cloridrato de Isoproterenol	0,83 mg / 5 ml	0,0167 % (p/v)
Iodeto de Potássio	50,00 mg / 5 ml	1,000 % (p/v)

Outros componentes:

Glucose	1250,00 mg / 5 ml	25,000 % (p/v)
Metabissulfito de sódio	5,00 mg / 5 ml	0,100 % (p/v)
Sacarina sódica	26,50 mg / 5 ml	0,530 % (p/v)
Aroma de banana (artificial)	2,25 mg / 5 ml	0,045 % (p/v)
Cloreto de sódio	10,00 mg / 5 ml	0,200 % (p/v)
Caramelo	4,00 mg / 5 ml	0,080 % (p/v)
Álcool	816,00 mg / 5 ml	16,320 % (p/v)
Vanilina	25,00 mg / 5 ml	0,500 % (p/v)
Água purificada	q.b.p. 5 ml	100,000 % (p/v)

Trata-se de um elixir, obtido por dissolução dos princípios activos em suspensão aquosa formada principalmente por glucose e álcool.

A escolha dos excipientes foi adaptada a fim de otimizar o procedimento de fabricação devido ao princípio activo.

Os excipientes escolhidos têm as seguintes funções:

Glucose	edulcorante
Metabissulfito de sódio	conservante
Sacarina sódica	edulcorante
Aroma de banana (artificial)	aromatizante
Cloreto de sódio	tampão
Caramelo	corante
Álcool	conservante/dissolvente
Vanilina	aromatizante
Água purificada	diluyente/veículo

O acondicionamento é efectuado em frascos âmbar de 200 ml rolhados com tampas invioláveis de polietileno “astra”.

Bibliografia

8. BIBLIOGRAFIA

- Abou-Donia, M B. (1995) Metabolism and Toxicokinetics of Xenobiotics. In CRC Handbook of Toxicology. Derelanko, M J and Hollinger, M A. (eds.), New York, CRC Press, Inc.: 539-589.
- Ames, B N, Cathcart, R, Schivears, E, and Hochstein, P. (1981) Uric acid provides and antioxidant defense in Humans against oxidant and radical caused aging and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 78: 6858-6862.
- Anderson, N G. (1953) Mass isolation of whole cells from rat liver. Science, 117: 627-628.
- Anklam, E, Gaglione, S & Müller, A. (1997) Oxidation behaviour of vanillin in diary products. Food Chemistry, 60 (1): 43-51.
- Aruoma, O I, Evans, P J, Kaur, H, Sutcliffe, L and Halliwell, B. (1990) An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox C, vitamin E and probucol. Free Radical Research 10 (3): 143-157.
- Azri, S., Gandolfi, A J and Brendel, K. (1990) Precision-Cut Liver Slices: An *In Vitro* System for Profiling Potential Hepatotoxicants. *In Vitro Toxicology*, 3 (4): 309-320.
- Baez, S, Segura-Aguilar, J, Widersten, M, Johansson, A S and Mannervik, B. (1997) Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. Biochemical Journal, 324: 25-28.
- Bailey, S M and Cunningham, C C. (1998) Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh isolated rat hepatocytes. Hepatology, 28 (5): 1318-1326.
- Bamforth, K J, Jones, A L, Roberts, RC, Coughtrie, M W. (1993) Common food additives are potent inhibitors of human liver 17 alpha-ethinyloestradiol and dopamine sulphotransferases. Biochemical Pharmacology, 17; 46 (10): 1713-1720.
- Barile, F A. (1994) In Introduction to *in vitro* cytotoxicology: mechanisms and methods - cellular methods of general toxicity. CRC Press, Inc., London: 47-57.
- Bast, A, Haenen, G and Doelman, C. (1991) Oxidants and antioxidants: state of the art. American Journal of Medicine, 91: 2S-13S.
- Belinsky, S A, Popp, J A, Kaufmann, F C and Thurman, R G. (1984) Trypan blue uptake as a new method to investigate hepatotoxicity in periportal and pericentral regions of the liver: studies with allyl alcohol in the perfused liver. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 230 (3): 755-760.
- Bergmeyer, H U., Brent, E. and Hess, B. (1965) In: Methods in Enzymatic Analysis Ed. Bergmeyer: 736-743.
- Bernecker, C. (1969) Potassium iodide in bronchial asthma. British Medical Journal. 25: 236.

- Berry, M N, Halls, J H and Grivell, M B. (1992) Techniques for Pharmacological and Toxicological Studies with Isolated Hepatocytes Suspensions. *Life Sciences*, 51: 1-16.
- Berry, M N. (1962) Metabolic properties of cells isolated from adult mouse liver. *Journal of Cell Biology*, 15: 1-8.
- Berry, M N., Edwards, A M., and Barritt, G J. (1991) Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Applications: Assessment of Integrity of Isolated Hepatocytes. In Burdon, R H. and Knippenberg, P H. (eds.). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, New York: 83-120.
- Blaabouuer, B J. (1992) Isolated hepatocytes: properties and application to toxicity testing. In *In vitro* toxicological studies and real time analysis of residues in food: 25-30.
- Blaabouuer, B J, Boobis, A R, Castell, J V, Coecke, S, Groothius, G M M, Guillouzo, A, Hall, T J, Hawksworth, G M, Lorenzo, G, Miltenburger, H G, Rogiers, V, Skett, P, Villa, P, Wiebel, F J. (1993) Practical applicability of hepatocyte cultures. The report and recommendations of ECVAM.
- Bodell, W J, Ye, Q, Pathak, D N and Pongracz, K. (1998) Oxidation of eugenol to form adducts and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: role of quinone methide derivative in DNA formation. *Carcinogenesis*, 19 (3): 437-443.
- Bolton, J L, Comeau, E and Vukomanovic, V. (1995) The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxy-quinone methides: evidence that pi-conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol. *Chemico-Biological Interactions*, 95 (3): 279-290.
- Branster, M V, Morton, R K. (1957) Isolation of intact liver cells. *Nature*, 180: 1283-1284.
- Budavary S, O'Neil M J, Smith, A. (Eds) (1989) In *The Index Merck—An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 11th edition. Merck & Co., Inc. Rahway, USA.
- Buege, J A and Aust, S D (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzimology*, 52:302-310.
- Carvalho, F D, Bastos, M L, Ferreira, M A. (1993) Hepatotoxicidade do paracetamol. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde*, 19: 15-25.
- Carvalho, F D, Remião, F, Vale, P, Timbrell, J A, Bastos, M L and Ferreira, M A. (1994) Glutathione and Cysteine Measurement in Biological Samples by HPLC with Glassy Carbon Working Detector. *Biomedical Chromatography*, 8: 134-136
- Carvalho, F, Remião F, Soares, M A, Queiroz, G and Bastos M L. (1997) d-Amphetamine-induced hepatotoxicity: possible contribution of catecholamines and hyperthermia to the effect studied in isolated rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 71: 429-436.
- Carvalho, F, Remião, F, Amado, F, Domingues, P, Correia, A J F and Bastos, M L. (1996) d-Amphetamine interaction with glutathione in freshly isolated rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 9: 1031-1036.

- Charbonneau, M, Brodeur, J, Souich, P, and Plaa, G L. (1986) Correlation Between Acetone-Potentiated CCl₄-Induced Liver Injury and Blood Concentrations After Inhalation or Oral Administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 84, 286-294.
- Cobrerros, A, Sainz, L, Lasheras, B, Cenarruzabeitia, F. (1997) Hepatotoxicity of ethanol: protective effect of calcium channel blockers in isolated hepatocytes. *Liver*, 17: 76-82.
- Cobrerros, A, Sainz, L, Lasheras, B, Cenarruzabeitia, F. (1997) Hepatotoxicity of ethanol: protective effect of calcium channel blockers in isolated hepatocytes. *Liver*, 17: 76-82.
- CPO - Clinical Pharmacology Online – An electronic drug reference (1997) Gold Standard Multimedia Inc.
- Cruickshank, D, Sansom L N, Veronese, M E, Mojarrabi, B, McManus, M E, Zhu, X. (1993) cDNA expression studies of rat liver aryl sulphotransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 26; 191 (1): 295-301.
- Dekant, W and Vamvakas, S. (1993) Glutathione-dependent bioactivation of xenobiotics. *Xenobiotica*, 23 (8): 873-887.
- DeLeve, L D and Kaplowitz, N. (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology and Therapeutics*, 52: 287-305.
- Dianzani, M U. (1985) Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. *Alcohol & Alcoholism*, 20 (2): 161-173.
- Dring, L G, Smith, R L and Williams, R T. (1970) The Metabolic Fate of Amphetamine in Man and other Species. *Biochemical Journal*, 116: 425-435.
- Edwardson, J W, Bang, N U. (1981) Deleterious effects of calcium deprivation on freshly isolated hepatocytes. *American Journal of Physiology*, 241: C3-8.
- Fariss, M W, Brown, M K, Schmitz, J A and Reed, D J. (1985) Mechanism of Chemical-Induced Toxicity: 1- Use of a Rapid Technique for the Separation of Viable and Nonviable Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79: 283-295.
- Feller, D R, Malspeis, L. (1977) Biotransformation of D(-)-ephedrine and L(+)-ephedrine in the rabbit, in vivo and in vitro. *Drug Metabolism and Disposition* 5 (1): 37-46.
- Fernandes, E, Carvalho, F, Remião, F, Bastos, M L, Pinto, M M and Gottlieb, O R. (1995) Hepatoprotective activity of xanthenes and xanthonolignoids against *tert*-butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated rat hepatocytes – comparison with silybin. *Pharmaceutical Research*, 12 (11): 1756-1760.
- FP VI - Farmacopeia Portuguesa VI . Infarmed (ed.), Lisboa, 1997.
- Gad, S C. (1994) In *In vitro Toxicology*, 1st ed., Gad, S C (ed), Raven Press, New York.
- Gad, S C. (1995) Alternatives to *in vivo* studies in Toxicology. In *General & Applied Toxicology*, Abridged ed., Ballatyne, B, Marrs, T, and Turner, P (eds.), Mcmillan Press Ltd, London: 169-196.

- Gandolfi, A J, Wijeweera, J and Brendel, K. (1996) Use of Precision-Cut Liver Slices as an *In Vitro* Tool for Evaluating Liver Function. *Toxicology and Pathology*, 24 (1): 58-61.
- Gérard-Monnier, D, Chaudiere, J. (1996) Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Pathologie Biologie*, 44 (1): 77-85.
- Gerosa, R, Borin, M, Menegazzi, G, Puttini, M and Cavalleri, G. (1996) In Vitro evaluation of the cytotoxicity of pure eugenol. *Journal of Endodontics*, 22 (10): 532-534.
- Gille G and Sigler, K. (1995) Oxidative Stress and Living Cells. *Folia Microbiologica*, 40: 131-152.
- Gilman, S A. (1996) In Goodman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman, J G, Limbird, L E, and Gilman, G A. (eds.) 9th Edition, versão em CD-ROM.
- Goethals, F and Roberfroid, M. (1994) General Toxicology: Developments in *In Vitro* Modelling - Alternatives in Testing for Hepatotoxicity. In ETC Course on General Toxicology: Principles, Applied Aspects of Toxicological Risk Assessment and International Regulatory Issues, Lindau, Germany.
- Green, C E, LeValley, S E and Tyson, C A. (1986) Comparison of Amphetamine Metabolism Using Isolated Hepatocytes from Five Species Including Human. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 237 (3): 931-936.
- Gregus, Z and Klaassen C D. (1996) Mechanisms of Toxicity. In Casarett & Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons, 5th ed. Klaassen, C D. (ed.), Amdur M O, and Doull, J (ed. emeriti), McGraw-Hill, New York: 35-74.
- Günther, T, Vormann, J, and Höllriegel, V. (1992) Isoproterenol-induced Mg²⁺ uptake in liver. *FEBS Letters*, 397 (3): 333-336.
- Gutteridge, J M. (1981) Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Letters*, 128: 343-346.
- Guzzie, P J. (1994) Lethality testing. In *In vitro* toxicology. Gad, S C. 1st Ed. Raven Press, New York: 57-86.
- Halliwell, B, Murcia, M A, Chirico, S, and Aruoma, O I. (1995) Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35 (1&2): 7-20.
- Halliwell, B. (1991) Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source Biochemistry, and Role in Human Disease. *American Journal of Medicine*, 91: 14S-22S.
- Halliwell, B. (1996) Vitamin C: Antioxidant or Pro-oxidant *In Vivo*? *Free Radical Research*, 25: 439-454.
- Ham, A W. (1975) Tratado de Histologia, 7^a ed., Interamericana, Brasil: 637-669.
- Högberg, J, and Kristoferson, A. (1977) A correlation between glutathione levels and cellular damage in isolated hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 74: 77-82.

- Howard, R B, Christensen, A K, Gibbs, F A, Pesch, L A. (1967) The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *Journal of Cell Biology*, 35 (3): 675-684.
- Jauregui, H O, Hayner, N T, Driscoll, J L, Williams-Holland, R, Lipsky, M H and Galletti, P M. (1981) Trypan Blue Dye Uptake and Lactate Dehydrogenase in Adult Hepatocytes - Freshly Isolated Cells, Cell Suspensions, and Primary Monolayer Cultures. *In Vitro*, 17: 1100-1110.
- Jewell, S A, Di Monte, D, Richelmi, P, Bellomo, G and Orrenius, S. (1986) Tert-Butylhidroperoxyde - Induced Toxicity in Isolated Hepatocytes: Contribution of Thiol Oxidation and Lipid Peroxidation. *Journal of Biochemical Toxicology*, 1: 13-22.
- Jungermann, K and Katz, N. (1989) Functional Specialization of Different Hepatocyte Populations. *Physiological Reviews*, 69 (3): 708-764.
- Junqueira, LC, e Carneiro, J. (1990) *Histologia Básica*, 7ª ed., Editora Guanabara: 240-254.
- Kaul, N, Siveski-Iliskovic, N, Hill, M, Slezak, J and Singal, P K. (1993) Free Radicals and Heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 30: 55-67.
- Klaassen, C D and Stacey, N H. (1982) Use of Isolated Hepatocytes in Toxicity. In Plaa, G, and Hewitt, W R. (eds.) *Toxicology of the Liver*. Raven Press, New York: 147-179.
- Klaassen, C D and Stacey, N H. (1982) Use of Isolated Hepatocytes in Toxicity. In *Toxicology of the Liver*. Plaa, G and Hewitt, W R (eds.), Raven Press, New York: 147-179.
- Kolb, H A, Adam, G. (1967) Regulation of ion permeabilities of isolated rat liver cells by external calcium concentrations and temperature. *Journal of Membrane Biology*, 26: 121-151.
- Korzeniewski, C, Callewaert, D M. (1983) An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 64: 313-330.
- Kretzschmar, M and Klinger, W. (1990) The Hepatic Gluthathione System - Influences of Xenobiotics. *Experimental Pathology*, 38: 145-164.
- Lasfargues, E Y. (1957) Cultivation and behaviour in vitro of the normal mamary epithelium of the adult mouse. *Anatomical Record*, 127: 117-125.
- Laughton, M J, Evans, P J, Moroney, M A, Hoult J R and Halliwell, B. (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and iron ion-reducinng ability. *Biochemical Pharmacology*, 42 (9): 1673-1681.
- Li, A P. (1994) Primary Hepatocyte Culture as an *In Vitro* Toxicological System of the Liver. In *In Vitro Toxicology*, 1st ed., Gad, S C (ed.), Raven Press, New York: 195-220.

- Liebler, D C and Reed, D J. (1997) Free-radical Defense and Repair Mechanisms. In Free Radical Toxicology, 1st ed., Wallace, K B (ed.), Taylors & Francis, Washington: 141-171.
- Lillie, R S. (1906) The relation of ions to contractile process. 1 The action of salt solutions on the ciliated epithelium of *Mytilus edulis*. The American Journal of Physiology, 17: 89-141.
- Liu, J and Mori, A. (1993) Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzylalcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. Neuropharmacology, 32 (7): 659-669.
- López, C, Jiménez, A, Terencio, J, Marín, A and Bello, J. (1996) Evaluación del potencial citotóxico de tensioactivos mediante ensayo del MTT en distintas líneas celulares. Reviews in Toxicology, 13: 13-19.
- Loretz, L J, Li, A P, Flye, M W and Wilson, A G E. (1989) Optimization of Cryopreservation Procedures for Rat and Human Hepatocytes. Xenobiotica, 19: 489-498.
- Mandl, I, MacLennan, J D, Howes, E L. (1953) Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. Histolyticum*. Journal of Clinical Investigation, 32: 1323-1329.
- Martínez, O M and Sáinz, A G. (1993) Hepatocyte homologous β 2-adrenergic desensitization is associated with a decrease in a number of plasma membrane β 2-adrenoceptors. European Journal of Pharmacology – Molecular Pharmacology Section, 244: 145-151.
- Mehendale, H M. (1994) Application of Isolated Organ Perfusion Techniques in Toxicology. In Principles and Methods of Toxicology, 3rd ed., Hayes, A.W (ed.), Raven Press, New York: 1157-1200.
- Mennes, W C, Holsteijn, C W M, Iersel, A A J, Yap, S H and Blaabouer, B J. (1994) Interindividual Variation in Biotransformation and Cytotoxicity of Bromobenzene as Determined in Primary Hepatocyte Cultures Derived from Monkey and Human Liver. Human & Experimental Toxicology, 13: 415-421.
- Minton, NA and Henry, JA. (1996) acute and chronic human toxicity of theophylline. Human and Experimental Toxicology, 15: 471-481.
- Mizutani *et al.* (1991a) Hepatotoxicity of eugenol in mice depleted of glutathione by treatment of DL-buthionine sulfoximine. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 71 (2): 219-230.
- Mizutani, T, Satoh, K, Nomura, H. (1991b) Hepatotoxicity of eugenol and related compounds in mice depleted of glutathione: structural requirements for toxic potency. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 73 (1): 87-95.

- Moffat, A C. (1986) In Clarke's Isolation and Identification of Drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Jackson, J V, Moss, M S, Widdop, P and Moffat, A C.(eds.) Second Edition, Pharmaceutical Press, London.
- Moldéus, P, Högberg, J and Orrenius, S. (1978) Isolation and Use of Liver Cells. *Methods in Enzimology*, 52: 60-71.
- Monks, T M and Lau, S S. (1992) Toxicology of quinone-thioethers. *Critical Reviews In Toxicology*, 22 (5/6): 243-270.
- Monks, TJ and Lau, SS. (1997) Biological reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates. *Chemical Research in Toxicology*, 10: 1296-1313.
- Morgan, W A. (1995) Pyridine nucleotide hydrolysis and interconversion in rat hepatocytes during oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, 49 (9): 1179-1184.
- Moslen, M T. (1996) Toxic Responses of the Liver. In Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th ed., Klaassen, C D. (ed.), McGraw-Hill, New York: 403-415.
- Nakagawa, Y and Moldéus, P. (1992a) Cytotoxic effects of phenyl-hydroquinone and some hydroquinones on isolated rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, 44 (6): 1059-1065.
- Nakagawa, Y, Moldéus, P, Moore, G A. (1992b) Cytotoxicity of *ortho*-phenylphenol in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 43 (2): 159-165.
- O'Donnel, J. (1994a) Theophylline misadventures: part I. *Neonatal Network*, 13 (2): 35-43.
- O'Donnel, J. (1994b) Theophylline misadventures: part II. *Neonatal Network*, 13 (3): 19-28.
- O'Rourke, P P, Crone, R K. (1984) Effect of isoproterenol on measured theophylline levels. *Critical Care Medicine*, 12 (4): 373-375.
- Palmeira, C M, Moreno, A J, Madeira, V M C. (1994) Metabolic alterations in hepatocytes promoted by the herbicides paraquate, dinoseb and 2,4-D. *Archives of Toxicology*, 68 (1): 15-22.
- Parrish, A R, Gandolfi, A J and Brendel, K. (1995) Precision-Cut Tissue Slices: Applications in Pharmacology and Toxicology. *Life Sciences*, 57 (21): 1887-1901.
- Plaa, G L and Charbonneau, M. (1994) Detection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury. In *Principles and Methods of Toxicology*, 3rd ed., Hayes, A W (ed.), Raven Press, New York: 839-870.
- Ramos, G. (1998) Modelos *In Vitro* para avaliações toxicológicas. Trabalho realizado no âmbito da parte curricular do Mestrado em Controlo de Qualidade – Área específica de medicamentos e plantas medicinais.
- Remião, F, Carmo, H, Ramos, G, Carvalho, F and Bastos, M L. (1999) Inhibition of Glutathione Reductase by Isoproterenol Oxidation Products. *Journal of Enzyme Inhibition*. *in press*.

- Remião, F, Ferreira, H, Ramos, G, Carvalho, F and Bastos, M L. (1998a) Inhibition of Glutathione Reductase by Isoproterenol Oxidation Products. *Toxicology Letters*, 95 (Suppl.1): 95.
- Remião, F M. (1998b) Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica. O coração como órgão alvo de toxicidade - Utilização de suspensões de cardiomiócitos de rato adulto para estudos de cardiotoxicidade.
- Reynolds, J E F. (ed.) (1996) In Martindale - The Extra Pharmacopoeia. 31st ed. London Royal Pharmaceutical Society, The Pharmaceutical Press, London.
- Ringer, S J. (1890) Concerning experiments to test the influences of sodium and potassium salts on the development of ova and growth of tadpoles. *Journal of Physiology*, 11: 79-84.
- Rodbell, M. (1964) Metabolism of isolated fat cells. 1. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 239: 375-380.
- Rossi, L, Moore, G A, Orrenius, S and O'Brien, P J. (1986) Quinone toxicity in hepatocytes without oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251 (1): 25-35.
- Sarmiento, A. (1994) Em: Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas – Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. Garrett, J, Osswald, W e Guimarães, S. (eds.) II Volume 3^a ed. Porto Editora, Porto: 700-715.
- Sasse, D, Spornitz, U M and Maly, I P. (1992) Liver Architecture. *Enzyme*, 46: 8-32.
- Sato, N, Iwata, S, Nakamura, K, Hori, T, Mori, K and Yodoi, J. (1995) Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. *The Journal of Immunology*, 154: 3194-3203.
- Schiller, C D, Kainz, A, Mynett, K, and Gescher, A. (1992) Assessment of Viability of Hepatocytes in Suspension Using the MTT Assay. *Toxicology In Vitro*, 6 (6): 575-578.
- Seglen, P O. (1976) Preparation of Isolated Rat Liver Cells. In *Methods in Cell Biology*, Prescott, D M (ed.), Academic Press, New York: 29-83.
- Sever, P S, Dring L G, Williams R T. (1975) The metabolism of (-)-ephedrine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 9 (2-3): 193-198.
- Sies, H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91: 31S-38S.
- Slater, T F. (1984) Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 105: 283-293.
- Smith, P F, Gandolfi, A J, Krumdieck, C L, Putnam, C W, Zukoski, C F, Davis, W M and Brendel, K. (1985) Dynamic Organ Culture of Precision Liver Slices for *In Vitro* Toxicology. *Life Sciences*, 36: 1367-1375.

- Smith, P F, Krack, G, McKee, R L, Johnson, D G, Gandolfi, A J, Hraby, V J, Krumdieck, C L and Brendel, K. (1986) Maintenance of Adult Rat Liver Slices in Dynamic Organ Culture. *In Vitro Toxicology*, 22 (12): 706-712.
- Snyder, R and Andrews, L S. (1996) In Casareth's & Doull's Toxicology-The Basic Science of Poisons. 5th ed. Klaassen, CD (ed.), McGraw-Hill, New York: 751-755.
- Strand, L P and Scheline, R R. (1975) The metabolism of vanillin and isovanillin in the rat. *Xenobiotica*, 5 (1): 49-63.
- Stravic, B. (1988) Methylxanthines: toxicity to humans. 1. Theophylline. *Food and Chemical Toxicology*, 26 (6): 541-565.
- Stubberfield, C R and Cohen, G M. (1988) NAD⁺ depletion and cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Biochemical pharmacology*, 37 (20): 3967-3974.
- Tamai, K, Tezuka, H, Kuroda, Y. (1992) Different modifications by vanillin in cytotoxicity and genetic changes by EMS and H₂O₂ in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Research*, 268 (2): 231-237
- Timbrell, J A. (1991) Toxic responses to foreign compounds. In Timbrell J A (ed.) *Principles of Biochemical Toxicology*, 2nd Edition. Taylor and Francis, London, 193-284.
- Thompson, D C, Barhoumi, R, and Burghardt, R C. (1998) Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 149 (1): 55-63.
- Thompson, D, Norbeck, K, Olsson, L I I, Constantin-Teodosiu, D, Vander Zee, J, and Moldéus, P. (1989) Peroxidase-catalyzes oxidation of eugenol: formation of a cytotoxic metabolite(s). *Journal of Biological Chemistry*, 264 (2): 1016-1021.
- Tinkelman, D G, Avner, S E. (1975) Ephedrine therapy in asthmatic children – clinical tolerance and absence of side effects. *Journal of the American Medical Association*, 237 (6): 553-557.
- Traber, G P., Chianale, J and Gumucio, J J. (1988) Physiologic Significance and Regulation of Hepatocellular Heterogeneity. *Gastroenterology*, 95: 1130-1143.
- Trenti, T, Sternieri, E, Ceccarelli, D, Gallesi, D and Masini, A. (1992) Production of lipid hydroperoxides and depletion of reduced glutathione in liver mitochondria after acute ethanol administration to rats. *Toxicology Letters*, 64/65: 751-755.
- Tsutsumi, M, Lasker, J M, Shimizu, M, Rosman, A S and Lieber, C S. (1989) Intralobular Distribution of Ethanol-Inducible P450IIE1 in Rat and Human Liver. *Hepatology*, 10 (4): 437-446.
- Ulrich, R G, Bacon, J A, Cramer, C T, Peng, G W, Petrella, D K, Stryd, R P, Sun, E L. (1995) Cultured hepatocytes as investigational models for hepatic toxicity: practical applications in drug discovery and development. *Toxicology Letters*. 82/83: 107-115.

- Upton, RA. (1991) Pharmacokinetic interactions between theophylline and other medication (Part I). *Clinical Pharmacokinetics*, 20 (1): 66-80.
- Vermeulen, N P E, Kelder, G D and Commandeur, J N M. (1993) Formation Of and Protection Against Toxic Reactive Intermediates. In *Perspectives in Medicinal Chemistry*. Teste, B, Kyburz, E, Fuhrer, W and Giger, R (eds.), VCH Publishers, Amsterdam, The Netherlands: 573-593.
- Wefers, H and Sies, H. (1988) The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *European Journal of Biochemistry*, 174: 353-357.
- Weisburger, J H, Grantham, P H, Vanhorn, E, Steigbigel, N H, Rall, D P and Weisburger, E K. (1964) Activation and Detoxification of N-2-Fluorenylacetamide in Man. *Cancer Research*, 24: 475-479.
- Wong, K P. (1982) Sulphate conjugation of isoprenaline by lung, small intestine and other organs. *Biochemical Pharmacology*, 31 (1): 59-62.
- Yang, R S H. (1994). *Toxicology of chemical mixtures – case studies, mechanisms, and novel approaches*. Edited by Raymond SH Yang, Academic Press, Inc.